

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

DISERTAČNÍ PRÁCE

Věra Králová

2011

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Doktorský studijní program

Lékařská biologie

**Účinky seleničitanu sodného na buňky lidského kolorektálního
karcinomu s odlišným p53 genotypem**

Effects of sodium selenite in human colon cancer cells with different
p53 status

RNDr. Věra Králová

Školitel: Doc. PharmDr. Emil Rudolf, PhD.

Hradec Králové

Datum obhajoby:

Prohlášení

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům. Souhlasím rovněž se zpřístupněním této práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

V Hradci Králové, 25. 3. 2011.

Poděkování

Děkuji školiteli doc. PharmDr. Emilu Rudolfovi, PhD za odborné vedení a pomoc v průběhu postgraduálního studia a při sestavení disertační práce. Dále děkuji vedoucímu Ústavu lékařské biologie a genetiky a děkanovi Lékařské fakulty UK v Hradci Králové prof. MUDr. RNDr. Miroslavu Červinkovi, CSc. za cenné rady, inspiraci a podporu ve studiu.

Také bych ráda poděkovala všem spolupracovníkům z našeho pracoviště za pomoc, povzbuzení a přátelskou pracovní atmosféru.

Seznam zkratek

5-FU	5-fluorouracil
7-AAD	7-aminoaktinomycin
ACF	aberrantní kryptové ložisko
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
Akt	v-akt homolog 3 myšního virového onkogenu
AOM	azoxymethan
APC	adenomatózní polypóza tlustého střeva
AP-1	aktivátorový protein 1
ASK1	apoptotický signál regulující kináza 1
ATCC	Americká banka tkáňových kultur
ATM	mutovaná u ataxia telangiectasia
ATR	příbuzná s ATM
Bcl-xl	bcl2-podobný 1
BRAF	homolog virového onkogenu V-raf
BrDU	bromodeoxyuridin
BSA	bovinní sérový albumin
BSO	L-buthionin-sulfoximin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DCC	deletovaný u kolorektálního karcinomu
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eagleovo médium
DMSO	dimethylsulfoxid
CIMP	metylátorový fenotyp CpG ostrůvků
CIN	chromozomální nestabilita
c-Myc	myelocytomatózní virový onkogen
COX-2	cyklooxygenáza 2
COXIBs	inhibitory cyklooxygenázy 2
CRC	kolorektální karcinom
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
ERK1/2	extracelulárními signály regulovaná kináza 1/2
FAO	Organizace OSN pro výživu a zemědělství
FAP	familiální adenomatózní polypóza střeva
FDA	vládní agentura USA pro potraviny a léčiva
FITC	fluorescein isothiokyanát
FLICA	fluorescenčně značený inhibitor kaspáz
GSK-3 β	glykogen syntáza kináza-3 β
GSH	redukováný glutathion
GSSG	oxidováný glutathion
GS-Se-SG	selenodiglutathion
HNPCC	hereditární nepolypózní karcinom střeva
IGF2	inzulinový růstový faktor 2
IL-6	interleukin 6
IKK	inhibitor kappa B kináza
JNK 1	c-Jun N-terminální kináza
KRAS	homolog virového onkogenu V-Ki-ras2

LC3B	lehký řetězec 3B
LAMP-1	membránový protein asociovaný s lysosomy
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza
MLH1	mutL homolog 1
MMR	systém opravy chybného párování bazí
MnTMPyP	Mn(III)tetrakis(1-Methyl-4-pyridyl)porfyrin pentachlorid
MRP	proteiny vícečetné rezistence k léčivům
MSH2	mutS homolog 2
MSH6	mutS homolog 6
MSI	mikrosatelitová nestabilita
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2 <i>H</i> - tetrazolium bromid
NADPH	redukovaný nikotinamidadenin dinukleotid fosfát
NCI	Národní institut pro výzkum rakoviny USA
NF-κB	jaderný faktor kappa B
PCNA	jaderný antigen proliferujících buněk
PFT-α	pifithrin-α
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PKC	protein kináza C
PMS2	zvýšený v postmeiotické segregaci 2
POD	peroxidáza
PTEN	fosfatázový a tensinový homolog
PUFAs	poly-nenasycené mastné kyseliny
RDA	doporučená denní dávka
ROS	reaktivní formy kyslíku
RTCA	analyzátor průběhu buněčné proliferace
SECIS	sekvence pro zařazení selenocysteinu
SMAD2	2. člen proteinové rodiny SMAD
SMAD4	4. člen proteinové rodiny SMAD
TGFβ	transformující růstový faktor β
TGFBR1	receptor 1 pro transformující růstový faktor
TGFBR2	receptor 2 pro transformující růstový faktor
TNFα	faktor nekrózy nádorů α
TNM	systém klasifikace zhoubných nádorů
TOKS	test okultního krvácení do stolice
TRAIL	apoptózu indukující ligand příbuzný s TNF-α
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
WST-1	5-(2,4-disulfonatofenyl)-3-(4-jodfenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2 <i>H</i> -tetrazolium

OBSAH

1. ÚVOD.....	3
2. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	5
KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM	
2.1. Epidemiologie kolorektálního karcinomu	5
2.2. Patogeneze CRC	5
2.3. Molekulární mechanismy patogeneze CRC	6
2.3.1. Nejdůležitější signální dráhy deregulované u CRC.....	7
2.3.2. Protein p53 v patogenezi CRC.....	8
2.3.3. Genomická nestabilita buněk CRC	9
2.3.4. Role zánětu v patogenezi CRC.....	11
2.3.5 miRNA v patogenezi CRC.....	12
2.4. Léčba a prevence CRC.....	12
SELEN V CHEMOPREVENCI NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ	
2.5. Chemické vlastnosti selenu.....	15
2.6. Metabolismus selenu.....	16
2.7. Selenoproteiny.....	17
2.8. Význam selenu pro zdraví člověka.....	19
2.9. Selen a nádorová onemocnění	20
2.10. Předpokládané mechanismy protinádorového působení selenu.....	22
3. CÍLE PRÁCE	27
4. MATERIÁL A METODY	28
4.1. Chemikálie.....	28
4.2. Spotřební materiál pro kultivaci buněk	29
4.3. Buňky a jejich kultivace.....	29
4.4. Testy v mikrotitračních destičkách	29
4.4.1. Nasazení buněk a ovlivnění seleničitanem sodným	29
4.4.2. Test metabolické aktivity (WST-1) a stanovení celkového množství	30
proteinů v buňkách (Coomassie Brilliant Blue)	
4.4.3. Test DNA syntézy	30
4.5. Časosběrná videomikroskopie	31
4.6. Průtoková cytometrie	31

4.6.1. Analýza buněčného cyklu metodou kombinovaného barvení 31	31
anti-cyklin A2/7-AAD	
4.6.2. Stanovení sub G1 frakce buněčného cyklu 32	32
4.6.3. Detekce aktivních kaspáz 3 a 7 pomocí 33	33
4.6.4. Vliv pifithrinu- α na aktivaci kaspáz po ovlivnění seleničitanem sodným 33	33
4.7. Detekce proteinů Western blottingem..... 34	34
4.8. Dynamické měření buněčné proliferace pomocí systému xCELLigence 35	35
4.8.1. Modulace účinků seleničitanu sodného prooxidantem (BSO) a antioxidantem (MnTMPyP)..... 35	35
4.8.2. Modulace účinků seleničitanu sodného pifithrinem- α 35	35
4.9. Fluorescenční mikroskopie 35	35
4.9.1. Detekce superoxidu v mitochondriích 35	35
4.9.2. Imunofluorescenční detekce fosforylovaného histonu H2A.X..... 36	36
4.9.3. Detekce monodansylcadaverinu 36	36
4.10. Statistické vyhodnocení 37	37
5. VÝSLEDKY 38	38
5.1. Metabolická aktivita a celkový obsah proteinů 38	38
5.2. Syntéza DNA..... 38	38
5.3. Proliferace a morfologie buněk 42	42
5.4. Analýza buněčného cyklu metodou kombinovaného barvení 42	42
anti-cyklin A2/7-AAD	
5.5. Změny v expresi proteinů spojených s buněčným cyklem 48	48
5.6. Stanovení sub G1 frakce buněčného cyklu 49	49
5.7. Aktivita kaspáz 3 a 7..... 51	51
5.8. Produkce superoxidu v mitochondriích 52	52
5.9. Vliv prooxidantu (BSO) a antioxidantu (MnTMPyP) na proliferaci buněk ovlivněných seleničitanem sodným..... 52	52
5.10. Poškození DNA a exprese proteinu p53 57	57
5.11. Vliv pifithrinu- α na antiproliferační a proapoptotické účinky seleničitanu sodného 60	60
5.12. Detekce autofagie..... 62	62
6. DISKUSE..... 65	65
7. ZÁVĚR..... 73	73
8. SEZNAM LITERATURY 74	74

1. ÚVOD

Nádorová onemocnění se stala jednou z nejčastějších příčin úmrtí a představují tak závažný lékařský a společenský problém. Klíčem k úspěšné léčbě je včasná diagnóza a účinný terapeutický režim. Pravidelná screeningová vyšetření zvyšují šanci zachytit onemocnění v jeho počátku, v léčebných postupech se začínají uplatňovat poznatky, které byly získány při studiu molekulárních mechanismů tumorigeneze. Není však pochyb o tom, že nejlepší strategie v boji proti nádorovým onemocněním spočívá v předcházení jejich vzniku, a proto se stále větší pozornost soustředí na prevenci vzniku a rozvoje malignit. K preventivním opatřením se řadí např. očkování proti patogenům spojeným s tumorigenezí, vyhledávání osob s genetickými predispozicemi a programy behaviorální prevence zaměřené na zdravý životní styl. Významnou roli hraje také chemoprevence, tj. snížení rizika vzniku a rozvoje nádorového onemocnění pomocí specifických složek diety nebo látek zaměřených na určitý molekulární cíl.

Buněčné linie odvozené z lidských nádorů se v průběhu druhé poloviny minulého století staly důležitým nástrojem ve výzkumu a vývoji látek s protinádorovými účinky. V poslední době si odborníci stále více uvědomují, že lidské nádory jsou mimořádně geneticky různorodé a že tato různorodost má za následek i rozdílnou odpověď jednotlivých nádorů na léčebný režim. Buněčné linie odvozené z nádorů si do značné míry zachovávají vlastnosti charakteristické pro jednotlivé typy nádorů a jsou tedy vhodným prostředkem pro studium vztahů mezi genotypem nádorových buněk a účinností léčiv. National Cancer Institute založil v roce 2006 platformu nazvanou CMT 1000 (Center for molecular Therapeutics 1000), zahrnující v současné době 1200 lidských nádorových buněčných linií, určenou pro testování a vývoj protinádorových látek [1].

V předkládané práci se věnujeme studiu chemopreventivních a protinádorových účinků seleničitanu sodného v modelu kolorektálního karcinomu *in vitro*, a to specificky v modelu dvou izogenních buněčných linií lišících se přítomností genu pro tumor-supresorový protein p53, který hraje významnou roli při rozvoji tohoto onemocnění.

Poznámky k použité terminologii:

Text práce obsahuje řadu názvů genů a proteinů. U většiny z nich jsme se řídili názvoslovím uvedeným v databázi HUGO Gene Nomenclature Committee, v některých případech jsme však dali přednost názvům, které se používají v odborné literatuře nejčastěji a jsou svým způsobem vžité (např. p53 místo TP53). Vzniká tím určitá nejednotnost, které jsme si vědomi, doufáme však, že přispěje k lepší srozumitelnosti textu.

2. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Kolorektální karcinom

2.1. Epidemiologie kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinom (colorectal carcinoma, CRC) představuje jedno z nejrozšířenějších onkologických onemocnění ve vyspělých zemích. Podle studie publikované v r. 2008 je kolorektální karcinom celosvětově třetím nejčastějším nádorovým onemocněním u mužů a druhým nejčastějším u žen. Počet nově diagnostikovaných případů byl v tomto roce odhadován na 1 233 000, s předpokládaným počtem úmrtí 608 000 osob. Téměř 60 % případů se vyskytuje v rozvinutých zemích, zejména v Severní Americe, Evropě a Austrálii, největší mortalita byla zjištěna ve střední a východní Evropě [2]. Česká republika se bohužel v mezinárodním srovnání ocitá na předních místech. Ročně je u nás diagnostikováno kolem 8000 nových případů kolorektálního karcinomu a přibližně 4500 postižených na toto onemocnění umírá. Nejvyšší zachyt nových případů se pohybuje ve věkovém rozmezí 60 – 75 let, 23 % nemocných je však mladších 60 let. Více než 50 % nových případů je bohužel diagnostikováno v pokročilých klinických stádiích onemocnění, což významně zhoršuje prognózu pacienta [3] .

2.2. Patogeneze CRC

Tlusté střevo je vystláno jednovrstevným epitelem, který tvoří invaginace nazývané Lieberkühnovy krypty, obsahující 2000-3000 buněk. Při bázi krypt se nacházejí kmenové buňky obklopené mezenchymální tkání. Tyto buňky produkují populaci tranzitních progenitorových buněk, které migrují směrem k ústí krypty a diferencují ve čtyři hlavní typy enterocytů: kolonocyty, pohárkové buňky, endokrinní buňky a Panethovy buňky. Životnost enterocytů je velmi krátká, po 3 -4 dnech od svého vzniku umírají apoptózou a jsou uvolněny do nitra střeva.

Kolorektální karcinom vzniká jako důsledek akumulace genetických a epigenetických změn, které přemění normální střevní epitel v invazivní

adenokarcinom. Nejčasnější stadia tohoto procesu představují aberantní kryptová ložiska (aberrant crypt foci, ACF), které se vyvíjejí v adenomy – oblasti dysplastické tkáně mající podobu polypů nebo plochých lézí. Maligní transformací těchto lézí vzniká karcinom *in situ* a později invazivní karcinom, který proniká střevní stěnou, šíří se do přilehlých orgánů a tkání a nakonec vede k tvorbě metastáz v regionálních lymfatických uzlinách a vzdálených orgánech. Přehled mezinárodní TNM klasifikace kolorektálního karcinomu podává Tab. 2-1.

Tab. 2-1 Stadia kolorektálního karcinomu podle TNM klasifikace. [4]

TNM	Stadium	Rozsah nádoru	5 let přežívá
Tis N0 M0	0	Karcinom <i>in situ</i>	100 %
T1 N0 M0	I	Invaze submukózy	93,2 %
T2 N0 M0	I	Invaze muscularis propria	90 %
T3 N0 M0	IIA	Invaze do subserózy nebo perikolické tkáně	84,7 %
T4 N0 M0	IIB	Perforace viscerálního peritonea nebo přímá invaze do přilehlých orgánů či tkání	72,2 %
T1-2 N1 M0	IIIA	T1-2 a metastázy v 1-3 regionálních lymfatických uzlinách	83,4 %
T3-4 N2 M0	IIIB	T3-4 a metastázy v 1-3 regionálních lymfatických uzlinách	64,1 %
Jakékoliv T N2 M0	IIIC	Metastázy ve 4 nebo více regionálních lymfatických uzlinách	44,3 %
Jakékoliv T, jakékoliv N M1	IV	Vzdálené metastázy	8,1 %

2.3. Molekulární mechanismy patogeneze CRC

V roce 1988 publikoval tým vedený prof. Vogelsteinem výsledky molekulární analýzy 172 kolorektálních neoplázií. Soubor zahrnoval sporadické adenomy, adenomy pacientů trpících familiální adenomatózní polypózou a rozvinuté kolorektální karcinomy. Autorům se podařilo identifikovat klíčové molekulární změny charakterizující jednotlivá stadia progresu onemocnění [5]. Výsledky tohoto výzkumu vedly k formulaci tzv. „tradiční cesty“ patogeneze kolorektálního karcinomu, nazývané

také „sekvence adenom-karcinom“, kdy normální střevní epitel je v důsledku akumulace genetických a epigenetických změn transformován nejprve v benigní adenom, poté v invazivní karcinom a nakonec v plně rozvinutý metastazující kolorektální tumor. Intenzivní výzkum, který následoval po této průlomové práci, vedl k odhalení dalších mechanismů patogeneze kolorektálního karcinomu a k doplnění původního modelu.

2.3.1. Nejdůležitější signální dráhy deregulované u CRC

Získané i vrozené mutace a epigenetické změny mají za následek deregulaci signálních drah kontrolujících buněčnou proliferaci, diferenciaci, apoptózu, angiogenezi a invazivitu. Klíčovou signální drahou v patogenezi CRC je Wnt – signální dráha, která je zodpovědná za udržování kompartmentu nediferencovaných kmenových buněk střevního epitelu. Mezenchymální buňky stromatu obklopující dna střevních krypt jsou zdrojem Wnt-signalizace, která udržuje v kmenových buňkách vysoké hladiny β -kateninu. Jak potomstvo kmenových buněk migruje vzhůru směrem k ústí krypty, Wnt-signalizace slábne, hladiny volného β -kateninu v buňkách rychle klesají, buňky ztrácejí svůj nediferencovaný fenotyp, opouštějí buněčný cyklus a diferencují ve funkční enterocyty. Za pokles volného β -kateninu v migrujících progenitorových buňkách je zodpovědná exprese genu APC, která je v těchto buňkách aktivována v důsledku slábnutí Wnt-signalizace. Protein APC tvoří komplex s β -kateninem a kinázou GSK-3 β , což vede k fosforylaci β -kateninu a jeho následné degradaci. Mutace v genu APC, případně v genu pro β -katenin, způsobují zadržení nediferencovaných proliferujících buněk ve stěně krypty. Protože tyto buňky nemigrují z krypty ven a nejsou odstraňovány apoptózou, může v nich docházet k akumulaci dalších změn a k progresi nádorového fenotypu. Z tohoto důvodu bývají mutace inaktivující protein APC, případně stabilizující β -katenin, jednou z prvních událostí v tumorigenezi CRC [6].

Deregulace dráhy epidermálního růstového faktoru (EGF) nastává rovněž v časných fázích vývoje kolorektálního karcinomu. Aktivace receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) vede prostřednictvím proteinu KRAS a jeho cíle BRAF k aktivaci MAPK signální dráhy, která stimuluje proliferaci a podporuje přežití buněk. Mutace v genu KRAS jsou přítomny u přibližně 40 % kolorektálních karcinomů. Typické mutace

postihují 12. nebo 13. kodón genu a inaktivují vnitřní GTP-ázovou aktivitu proteinu KRAS, což má za následek jeho trvalou aktivaci a tím konstitutivní mitogenní signalizaci [7]. Podobný účinek mají i mutace v genu BRAF, nacházené asi u 10-15% případů CRC [8]. Přítomnost mutace genu KRAS slouží jako významný ukazatel predikující rezistenci k léčbě monoklonálními protilátkami proti EGFR [9].

Mutace signální dráhy fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) jsou přítomny až ve 40 % případů CRC a podporují zřejmě přechod onemocnění od stadia adenomu ke karcinomu. Nejčastěji postiženými proteiny jsou p110 α (katalytická podjednotka PI3K) a dále PTEN, což je tumor supresorový protein negativně regulující PI3K signalizaci [10].

S maligní transformací adenomů jsou rovněž spojeny poruchy dráhy transformačního růstového faktoru β (TGF β). Inaktivující mutace postihují receptorové geny (TGFB2 a TGFB1) i geny pro transkripční faktory rodiny SMAD, zejména SMAD2 a SMAD4 [5, 11].

2.3.2. Protein p53 v patogenezi CRC

Protein p53 je transkripční faktor aktivovaný různými typy buněčného stresu. Specificky se váže na DNA a indukuje expresi řady genů hrajících roli v regulaci buněčného cyklu, opravě DNA a apoptóze [12]. Kromě této důležité úlohy v regulaci genové exprese je p53 aktivní také v cytoplazmě, kde spouští apoptózu a inhibuje autofagii mechanismy nezávislémi na transkripci [13]. Za normálních fyziologických podmínek se p53 rovněž účastní regulace energetického metabolismu a antioxidačních mechanismů buněk [14]. Všechny tyto funkce činí z proteinu p53 klíčový tumor-supresorový protein. Mutace v genu pro p53 jsou přítomny ve více než polovině případů nádorových onemocnění, ve většině zbylých případů nacházíme další poruchy v rámci dráhy p53, které interferují s jeho funkcí [15]. Zárodečné mutace genu pro p53 jsou základem dědičného Li-Fraumeniho syndromu, což je autosomálně dominantní onemocnění charakterizované časným výskytem různých typů nádorů, zejména sarkomů, leukémií, nádorů mozku, prsu a kůry nadledvin [16]. Většina mutací p53 v lidských nádorech jsou záměnové mutace vedoucí k syntéze stabilního proteinu, který však postrádá schopnost indukovat genovou expresi [17]. Ztráta funkce p53 umožňuje nádorové buňce uniknout apoptotické smrti a posilovat maligní fenotyp, což

vede často k rozvoji rezistence nádorových buněk vůči běžné radioterapii a chemoterapii, a proto se hledají terapeutické strategie, které by byly schopné obnovit funkčnost p53 dráhy u nádorů nesoucích mutovaný p53 [18].

V případě kolorektálního karcinomu jsou mutace v tumor supresorovém genu p53 nacházeny zejména v pozdních fázích progresu onemocnění (vyskytují se u 4-6 % adenomů, 50 % adenomů s invazivními ložisky a 50 – 75 % kolorektálních karcinomů) a korelují s agresivnějším fenotypem nádorových buněk [19]. Studie nazvaná „The p53 Colorectal Cancer International Collaborative Study“ shromáždila údaje o mutacích v p53 u 3583 případů kolorektálního karcinomu s cílem zjistit prognostický a prediktivní význam těchto mutací. Ze závěrů studie vyplývá, že mutace v p53 jsou u proximálních CRC spojeny se zvýšeným rizikem invaze do lymfatických tkání a u pokročilejších stadií onemocnění s celkově horší prognózou [20, 21]. Tato problematika se nadále intenzivně studuje, v současné době se však p53 genotyp jako prediktivní a prognostický ukazatel v léčbě CRC nevyužívá [22].

2.3.3. Genomická nestabilita buněk CRC

Předpokladem akumulace mutací v nádorových buňkách je nestabilita jejich genomu. V případě CRC byly popsány dva základní typy genetické nestability – chromosomální nestabilita (chromosomal instability, CIN) a mikrosatelitová nestabilita (microsatellite instability, MSI), které se kombinují s nestabilitou epigenetickou.

a) nádory s chromosomální nestabilitou (CIN)

Přibližně 80% kolorektálních karcinomů se vyvíjí „tradiční“ cestou, charakterizovanou chromosomální nestabilitou nádorových buněk. Tento typ nestability vede k akumulaci chromosomálních aberací a vzniku aneuploidních nádorových buněk. Typické molekulární změny zahrnují mutace nebo ztrátu tumor supresorového genu APC, mutace onkogenu KRAS, ztrátu oblasti 18q (geny SMAD a DCC) a konečně ztrátu genu p53 [5, 23]. Tyto změny však nemusí být v konkrétním nádoru přítomny všechny a nemusí nutně proběhnout ve stejném pořadí [24]. Zárodečné mutace v jedné z alel genu APC vedou u nositelů k rozvoji familiální adenomatózní polypózy střeva (familial adenomatous polyposis, FAP), kdy

u heterozygotních jedinců, nesoucích mutovanou alelu APC genu, dochází pravidelně ke ztrátě nebo inaktivaci zdravé alely genu, což má za následek růst mnohočetných polypů ve střešní sliznici a následný rozvoj kolorektálního karcinomu [25].

b) nádory s mikrosatelitovou nestabilitou (MSI)

Tento typ genetické nestability je zodpovědný za rozvoj 15-20% kolorektálních karcinomů. Hlavní příčinou nestability jsou tu mutace nebo aberantní metylace genů pro opravu chybného párování bazí (mismatch repair, MMR). Typickou změnou je epigenetické umlčení genu MLH1, dalšími postiženými geny bývají MSH2, MSH6 a PMS2. Zárodečné mutace některého z těchto genů jsou příčinou Lynchova syndromu, zvaného také hereditární nepolypózní rakovina střeva (hereditary non-polyposis colon cancer, HNPCC) [26]. Úkolem MMR systému je oprava bazí chybně zařazených DNA polymerázou během replikace. Selhání reparačního mechanismu vede k dramatickému zvýšení chyb zejména v repetitivních úsecích DNA, tzv. mikrosatelitech. Řada genů, které hrají roli v patogenezi kolorektálního karcinomu, obsahuje mikrosatelitové sekvence a je mutována v důsledku MSI, např. geny pro TGFB2, Bax, β -katenin, APC nebo IGF2. Sporadické, nikoli však dědičné MSI nádory nesou také často mutaci v genu BRAF, ve 30% MSI nádorů se rovněž objevují mutace PTEN [27].

Buňky nádorů typu MSI jsou diploidní, na rozdíl od nádorů s CIN. Pacienti s kolorektálním karcinomem typu MSI mají zpravidla lepší prognózu onemocnění ve srovnání s pacienty postiženými nádory typu CIN [28].

c) epigenetická nestabilita

Aberantní metylace promotorových oblastí genů může vést k umlčení exprese těchto genů. To je zvláště významné v případě tumor-supresorových genů, kde je hypermethylace promotorových oblastí často „druhým zásahem“ vedoucím k vyřazení zbývajících funkčních alel [29]. Rozsáhlé změny v metylaci DNA v buňkách kolorektálních karcinomů popsali již Feinberg a Vogelstein [30]. Epigenetické změny jsou přítomny již v nejčasnějších stádiích vývoje CRC – v dysplastických aberantních kryptových ložiscích a polypech. Epigenetická nestabilita se u kolorektálního karcinomu projevuje na jedné straně jako hypermethylace promotorových oblastí genů (CpG Island Methylator Phenotype, CIMP), na druhé straně jako globální hypomethylace. CIMP+ fenotyp je

obvykle definován jako metylace aspoň tří genů z vybraného panelu pěti markerů. Podle typu použitých markerů má 24 – 51 % kolorektálních karcinomů fenotyp CIMP+ [31]. Většina CIMP+ nádorů obsahuje i mutaci v genech BRAF nebo KRAS [32]. CIMP+ fenotyp se vyskytuje až u 75% sporadických kolorektálních karcinomů s mikrosatelitovou nestabilitou a bývá spojen s horší prognózou onemocnění [33].

2.3.4. Role zánětu v patogenezi CRC

Zánětlivá onemocnění střev, jakými jsou například Crohnova choroba a ulcerativní kolitida, těžce poškozují sliznici střeva a zvyšují riziko vzniku CRC u postižených jedinců. V posledních letech byla identifikována řada molekul spojených se zánětlivým procesem, které zásadním způsobem přispívají k patogenezi CRC. Jedná se zejména o aktivaci IKK/NF- κ B signální dráhy. NF- κ B je dimerní transkripční faktor složený ze členů proteinové rodiny Rel. Faktory vyvolávající zánět ve střevní sliznici způsobují prostřednictvím Toll-like receptorů a TNF- α signalizace zvýšení exprese NF- κ B v epiteliálních buňkách a buňkách imunitního systému. NF- κ B stimuluje expresi cyklinu D, c-Myc a Bcl-xl v epiteliálních buňkách a rovněž expresi angiogenních faktorů, chemokinů a cytokinů jako TNF- α a IL-6 v imunitních buňkách [34]. Chronická produkce malých dávek TNF- α podporuje všechna stadia progresu nádorového onemocnění, od růstu, přes invazi až po metastatický rozsev [35]. Důležitou roli v tomto procesu hraje cyklooxygenáza-2 (COX-2), enzym katalyzující syntézu prostaglandinů z arachidonové kyseliny. Exprese COX-2 je zvýšena u přibližně 80 % CRC a 40 % kolorektálních adenomů. Pod jejím vlivem dochází v buňkách k aktivaci Bcl-2, matrixové metaloproteinázy-2, vaskulárního endoteliálního faktoru a dalších proteinů, což vede ke zvýšení rezistence k apoptóze a stimulaci invazivity a angiogeneze [36].

2.3.5. miRNA v patogenezi CRC

miRNA (mikroRNA) jsou nekódující jednovláknové RNA o délce přibližně 22 nukleotidů, které negativně regulují genovou expresi a ovlivňují široké spektrum buněčných procesů jako je proliferace, diferenciace a apoptóza. Nové poznatky ukazují, že miRNA a rovněž faktory účastníci se jejich biogeneze mohou působit jako onkogeny nebo tumor supresory a přispívat tak ke vzniku a rozvoji nádorového onemocnění [37]. V případě CRC byla popsána celá řada miRNA deregulovaných ve srovnání s normální tkání a ovlivňujících klíčové signální dráhy účastníci se vývoje CRC [38].

2.4. Léčba a prevence CRC

Základní metodou léčby kolorektálního karcinomu je chirurgické odstranění nádorové tkáně. Velmi malé nádory ve stadiu polypu lze odstranit při kolonoskopii, u větších nádorů se odstraňuje i část okolní zdravé tkáně a přilehlé lymfatické uzliny. Výkonu může předcházet neoadjuvantní chemoterapie s cílem zmenšit nádor. Po chirurgickém odstranění nádoru následuje adjuvantní (zajišťovací) terapie sloužící k eliminaci zbývajících nádorových buněk a k prevenci návratu onemocnění. Chemoterapeutika se podávají i pacientům v pokročilých stádiích onemocnění. V případě metastáz se užívá rovněž biologické léčby monoklonálními protilátkami v kombinaci s chemoterapií. Přehled používaných léčiv podává Tab. 2-2.

Čím dříve je onemocnění diagnostikováno, tím větší má pacient naději na úspěšnou léčbu. Ideální je zachytit co nejčasnější stadia vývoje CRC u bezpříznakových jedinců. V České republice se od roku 2000 provádí v rámci screeningu test na přítomnost okultního krvácení do stolice (TOKS). V případě pozitivního výsledku je potom indikováno kolonoskopické vyšetření. Diskutuje se rovněž o potřebě zavedení primárního kolonoskopického screeningu [39]. Tyto metody představují tzv. sekundární prevenci.

Tab. 2-2 Léky používané v systémové terapii kolorektálního karcinomu. Převzato z [4].

Lék	Charakteristika	Způsob podání	Toxicita	Využití v léčbě CRC
5-fluorouracil	Analog fluoropyrimidinu, cytostatikum ze skupiny antimetabolitů.	Intravenózní (kontinuální infuze nebo bolusové podání.	Průjem, myelosuprese, iritace konjunktivální a nosní sliznice, hyperpigmentace v průběhu žil.	Základní cytostatikum v adjuvantní, neoadjuvantní a paliativní léčbě.
Leukovorin	Kyselina folinová (5-formyl tetrahydrofolát)	Intravenózní, perorální.	Potencuje účinek 5-FU.	Vždy v kombinaci s 5-FU (vytváří s fluorouridinem komplex, který blokuje další tvorbu thymidinu).
Capecitabin	Derivát fluoropyrimidinu, cytostatikum ze skupiny antimetabolitů	Perorální	Průjem, hand-foot syndrom, myelosuprese, nauzea.	Ekvivalentní infúznímu režimu 5-FULV. Využívá se v adjuvanci, neoadjuvanci a paliaci.
Oxaliplatina	Platinové cytostatikum	Intravenózní	Akutní a chronické polyneuropatie, nauzea, zvracení, mírná myelosuprese, alergické reakce.	Lék první volby v kombinaci s fluoropyrimidinem v adjuvantní, neoadjuvantní a paliativní terapii.
Irinotecan	Inhibitor topoizomerázy I	Intravenózní	Průjem, myelosuprese, zvracení.	Paliativní chemoterapie. Podává se v monoterapii nebo v kombinaci s 5-FU
Bevacizumab	Rekombinantní humanizovaná monoklonální protilátka proti VEGF	Intravenózní	Tromboembolie (arteriální i venózní), gastrointestinální perforace, zhoršené hojení ran, hypertenze, proteinurie.	Metastazující karcinom, v kombinaci s chemoterapeutickým režimem obsahujícím fluoropyrimidin
Cetuximab	Chimerická monoklonální protilátka proti EGFR	Intravenózní	Těžké alergické reakce, exantém, suchá kůže, kožní fisury, průjmy, hypomagnezémie.	Metastazující karcinom, jehož buňky exprimují EGFR a obsahují nemutovaný gen K-ras, v kombinaci s chemoterapií nebo samostatně, u pacientů, u kterých selhala léčba oxaliplatinou a irinotecanem a kteří nesnáší irinotecan.
Panitumumab	Humánní monoklonální protilátka proti EGFR	Intravenózní	Alergická reakce, průjem, hypomagnezémie, exantém	3. linie paliativní terapie metastatického karcinomu, jehož buňky exprimují EGFR a obsahují nemutovaný gen K-ras. Podává se v monoterapii pacientů, u kterých selhala léčba režimy obsahujícími fluoropyrimidin, oxaliplatinu a irinotecan.

Primární prevence CRC znamená předcházení vzniku onemocnění ovlivněním faktorů vnějšího prostředí. Jedná se zejména o vhodný životní styl, tedy o vyváženou skladbu potravy, udržování optimální tělesné hmotnosti a pravidelnou pohybovou aktivitu. National Cancer Institute (NCI) v USA vydal pro předcházení vzniku rakoviny následující doporučení [40] :

1. Udržovat přiměřenou tělesnou hmotnost.
2. Jíst pestrou stravu v menších množstvích.
3. Denně konzumovat dostatek ovoce a zeleniny.
4. Konzumovat dostatek potravin s vysokým obsahem vlákniny, např. obiloviny, výrobky z celozrnné mouky a luštěniny.
5. Omezit celkovou spotřebu tuků.
6. Omezit spotřebu alkoholu.
7. Omezit spotřebu kuchyňské soli a potravin konzervovaných dusitanovými solemi.

Pokud se hovoří o chemoprevenci CRC, znamená to na jedné straně vyloučení škodlivých látek z diety, na druhé straně začlenění látek působících proti vzniku a rozvoji nádorového bujení, ať už přírodních, nebo syntetických. Tyto látky a faktory jsou studovány na různých úrovních, od *in vitro* modelů přes studie na pokusných zvířatech až po epidemiologické a klinické studie různého typu a rozsahu. Spektrum testovaných faktorů je velmi široké, od těch komplexních typu „konzumace ovoce a zeleniny“ až po farmaka snažící se zasáhnout specifický mechanismus v patogenezi CRC.

K posledně jmenovaným patří například kyselina ursodeoxycholová, která snižuje hladiny žlučových kyselin ve střevě a zřejmě působí chemopreventivně zejména u pacientů se zánětlivými střevními onemocněními [41]. Rozsáhlá pozornost se věnuje chemopreventivním účinkům nesteroidních protizánětlivých léků jako aspirin, ibuprofen, sulindac a indometacin, které inhibují produkci prostaglandinu E2 zprostředkovanou enzymem COX-2. Výsledky studií svědčí o tom, že dlouhodobé pravidelné užívání těchto farmak snižuje riziko vzniku a rozvoje CRC, je však třeba brát v úvahu jejich vedlejší účinky, zejména zvýšení celkového nebo gastrointestinálního krvácení [42]. COX-2 je rovněž cílem další slibné skupiny inhibitorů, tzv. COXIBů (např.

celecoxib, valdecoxib), které vykazují menší gastrointestinální toxicitu, bohužel však závažně zvyšují riziko kardiovaskulárních příhod [43].

Většina látek, u nichž se předpokládá chemopreventivní působení je obvykle součástí komplexní diety, a je proto poměrně obtížné navrhnout a uskutečnit klinickou studii zaměřenou na zkoumání jejich chemopreventivních účinků tak, aby poskytla spolehlivé údaje. Zdá se, že příznivé výsledky přináší podávání kalcia, vitaminu D a kyseliny listové [44]. Řada přírodních látek obsažených v běžné zelenině, ovoci, obilovinách, koření a bylinách – jako polyfenoly, karotenoidy, flavonoidy, alkaloidy a organické sloučeniny síry - prokázala v *in vitro* a *in vivo* modelech schopnost zasahovat do různých mechanismů tumorigeneze [45, 46]. Kyselina listová a produkty trávení vlákniny jako butyrát jsou považovány za významné chemopreventivní faktory epigenetických změn [47]. Předmětem výzkumu jsou rovněž chemopreventivní účinky antioxidantů (např. vitaminů E a C) [48], poly-nenasycených mastných kyselin (PUFAs) [49], probiotik a prebiotik [50] a stopových prvků, zejména selenu.

Selen v chemoprevenci nádorových onemocnění

2.5. Chemické vlastnosti selenu

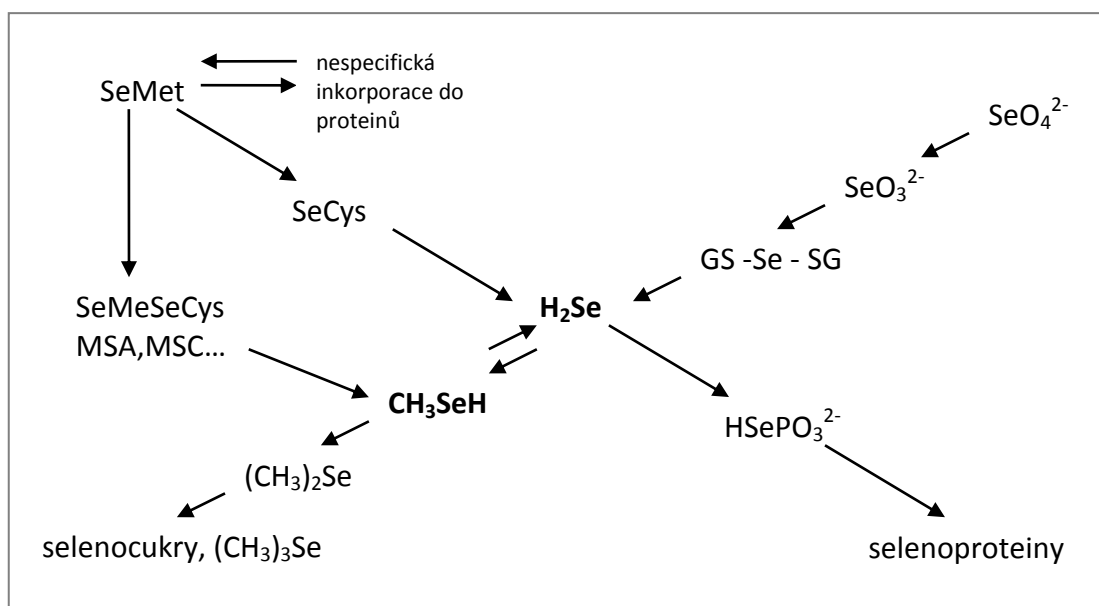
Selen je chemický prvek 6. hlavní podskupiny periodické tabulky. V přírodě existuje v oxidačních stavech $-II$, $-I$, 0 , $+IV$ a $+VI$, v anorganických i organických formách, v tuhém, tekutém i plynném skupenství. Nejvíce oxidovaný je selen ve formě selenanu SeO_4^{2-} a seleničitanu SeO_3^{2-} , nejvíce redukované formy představuje kyselina selenovodíková H_2Se a její soli selenidy, anorganické sloučeniny selenu s kovy. Chemické vlastnosti selenu a jeho sloučenin jsou podobné vlastnostem síry, nicméně v biologických systémech se chovají poněkud odlišně. Za fyziologického pH jsou thiohy jako např. cystein protonovány, zatímco selenohydrylové skupiny jsou disociovány. Selenocystein je také mnohem ochotnější donor elektronů než cystein, což způsobuje jeho mnohonásobně vyšší reaktivitu [51].

2.6. Metabolismus selenu

Selen vstupuje do potravního řetězce prostřednictvím rostlin. Rostliny přijímají z půdy hlavně anorganický selen ve formě selenanu a seleničitanu a přeměňují jej na selenomethionin, selenocystein a selenomethyl-selenocystein, které inkorporují do svých proteinů. Množství selenu absorbovaného rostlinami závisí na celé řadě faktorů, z nichž nejdůležitější je obsah selenu v půdě, chemická forma selenu, koncentrace dalších chemických prvků, kyselost půdy a typ pěstované rostliny. Obsah selenu v půdě se v různých oblastech světa značně liší a ovlivňuje tak hladiny selenu u jednotlivých lidských populací [52].

V potravinových doplňcích volně dostupných na trhu je selen přítomen jako anorganický seleničitan a selenan, nebo ve formě selenem obohacených pivovarských kvasnic, které obsahují zejména selenomethionin a menší podíl dalších forem selenu [53].

Metabolismus selenu v organismu živočichů a lidí je shrnut na Obr. 2-1. Selen vstupuje do metabolických reakcí v anorganické nebo organické formě. Anorganické formy selenu, seleničitan a selenan, jsou redukovány glutathionem na selenodiglutathion (GS-Se-SG), jenž je dále působením glutathion reduktázy nebo thioredoxin reduktázy redukován na hydrogen selenid H_2Se za spotřeby NADPH. Selenocystein je štěpen β -lyázou na selenol a alanin. Selenomethionin je transsulfurační reakcí přeměněn na selenocystein, nebo je z něho uvolněn methyselenol působením methionin- γ -lyázy. Selenomethionin může být také inkorporován nespecificky do proteinů místo methioninu. Selenomethyl-selenocystein a další methylované formy selenu jsou přímo konvertovány na methylselenol, který může být demethylován opět na hydrogen selenid. Hydrogen selenid je fosforylován na selenofosfát, jenž slouží jako zdroj selenu pro syntézu selenoproteinů. Vylučování selenu se děje prostřednictvím jeho vysoce methylovaných forem [54].



Obr.2-1. Metabolismus selenu. *SeMet* – selenomethionin, *SeCys* – selenocystein, *SeMeSeCys* – selenomethyl-selenocystein, *MSA* – kyselina methylselenová, *MSC* – methylselenocyanát, *GS – Se – SG* selenodiglutathion. Podle [55].

2.7. Selenoproteiny

Fyziologická role selenu je dána jeho přítomností v selenoproteinech, v nichž se selen vyskytuje ve formě selenocysteinu. Syntéza selenocysteinu probíhá kotranslačně, jeho zařazení do struktury proteinu je kódováno UGA kodónem za pomoci specifické 3'-UTR sekvence nazývané Sec-insertion sequence (SECIS); selenocystein tak představuje 21. aminokyselinu genetického kódu [56]. Buňka neobsahuje žádný volný selenocystein, neboť selenocystein přijatý z potravy je rychle metabolizován na hydrogen selenid, aby nedocházelo k náhodné inkorporaci této velmi reaktivní aminokyseliny do proteinů namísto cysteinu [57].

Dosud bylo popsáno 25 lidských selenoproteinů, funkce některých z nich však zatím zůstává neznámá. Účastní se klíčových buněčných procesů včetně biosyntézy deoxyribonukleotidů, odstraňování peroxidů, redukce oxidovaných proteinů a membrán, regulace redoxní signalizace a metabolismu hormonů štítné žlázy [58]. Přehled lidských selenoproteinů a jejich funkcí podává Tab. 2-3.

Tab. 2-3 Přehled lidských selenoproteinů a jejich funkcí. Podle [59].

Název proteinu	Lokalizace a funkce
Glutathion peroxidáza-1	Cytosolický enzym, antioxidační aktivita
Glutathion peroxidáza-2	Hlavně gastrointestinální trakt, játra, antioxidační aktivita
Glutathion peroxidáza-3	Plazma, antioxidační aktivita
Glutathion peroxidáza-4	Všeobecně rozšířená, zvláště vysoká hladina ve varlatech, antioxidační aktivita, důležitá pro vyžívání spermií
Glutathion peroxidáza-6	Embryo, oční nerv, neznámá funkce
Thioredoxin reduktáza-1	Intracelulární (cytosol + jádro), redoxní regulace, buněčná signalizace
Thioredoxin reduktáza-2	Mitochondriální, redoxní regulace
Thioredoxin reduktáza-3	Varlata, redoxní regulace
Jodothyronin 5'dejodináza-1	Ledviny, játra, štítná žláza, hnědá tuková tkáň, přeměňuje thyroxin na trijodothyronin
Jodothyronin 5'dejodináza-2	Štítná žláza, CNS, hnědá tuková tkáň, kosterní svalstvo, aktivace thyroidních hormonů
Jodothyronin 5'dejodináza-3	Placenta, CNS, plod, inaktivace thyroidních hormonů
Selenoprotein P	Plazma, většina tkání, vysoká hladina v mozku, játrech a varlatech, homeostáza selenu a jeho transport, antioxidační aktivita
Selenoprotein W	Většina tkání, hojný v mozku, střevě, kosterním svalstvu a prostatě, metabolické a antioxidační funkce
Selenoprotein N	Většina tkání, funkce neznámá
Selenoprotein S	Membránový protein, v endoplazmatickém retikulu, role v zánětlivé odpovědi, odstraňování špatně složených proteinů
Selenoprotein K	Membránový protein, endoplazmatické retikulum, snad antioxidační funkce
Selenoprotein R	Cytosol a jádro, antioxidační funkce, oprava proteinů, metabolismus methioninu
Selenoprotein H	Jádro, DNA-binding protein, regulace syntézy glutathionu, detoxifikace fáze II
Selenoprotein I	Neznámá lokalizace a funkce
Selenoprotein M	Endoplazmatické retikulum, skládání proteinů, antioxidační aktivita
Selenoprotein O	Neznámá lokalizace a funkce
Selenoprotein T	Neznámá lokalizace a funkce
Selenoprotein V	Varlata, neznámá funkce
15 kD selenoprotein	Endoplazmatické retikulum, podobný thioredoxinu, role při skládání proteinů
Selenofosfát syntetáza-2	Biosyntéza selenoproteinů

Selen může být v proteinech přítomen rovněž ve formě selenomethioninu. V tomto případě je inkorporován do proteinů nespecificky, namísto methioninu. Nastává to zejména v případech, kdy je poměr selenomethioninu k methioninu v buňkách vysoký [60].

2.8. Význam selenu pro zdraví člověka

Selen jako stopový prvek je nezbytnou součástí lidské diety. Hlavním zdrojem selenu jsou potraviny s vysokým obsahem bílkovin jako maso, ryby, vejce a luštěniny, dále mléčné výrobky, ořechy a některé druhy zeleniny a ovoce [61]. Stopová množství selenu jsou potřebná pro normální funkci organismu, mírně zvýšené množství lze skladovat a využít pro udržení homeostázy, avšak vysoké dávky selenu mohou vyvolat toxické účinky [62]. Doporučená denní dávka (Recommended Dietary Allowance, RDA) byla stanovena na 55 µg/den jako dávka, která maximalizuje aktivitu plazmatické glutathion peroxidázy [63]. V současné době však panují pochybnosti, zda je tento přístup vhodný a hledají se další relevantní biologické ukazatele [64]. FAO/WHO navrhuje denní dávku v množství 26 µg selenu pro ženy a 34 µg pro muže. Podobné potíže provázejí i snahu o stanovení maximální bezpečné denní dávky, která je zatím odhadnuta na 400 µg/den [65]. Jednotliví lidé se mohou zřejmě značně lišit v potřebě selenu a v toleranci ke zvýšeným dávkám. Podle zprávy WHO, která shrnula dostupné údaje z různých zemí světa, se koncentrace selenu v krvi zdravých lidí pohybují v rozmezí 0,5-2,5 µM, jiné prameny uvádějí koncentrační rozmezí 8 – 186 µg/l [61].

Toxické dávky selenu způsobují selenózu projevující se kožními, neurologickými a gastrointestinálními příznaky. Typická je ztráta vlasů, lámavost nehtů, vyrážka, nauzea a „česnekový“ dech. Toxicita selenu je spojena i s poruchami endokrinních funkcí, sníženou hladinou hormonu T₃, nedostatkem NK buněk a poškozením jater [66]. Závažné příznaky byly dávány do souvislosti s příjmem 3200 – 6700 µg selenu denně, mírnější příznaky, jako změny kvality nehtů, s příjmem 900 – 1260 µg selenu denně [67].

Nedostatek selenu vede k poruchám antioxidační ochrany, redoxní regulace a produkce energie v důsledku suboptimální produkce selenoproteinů. Extrémním

případem deficiencie selenu je tzv. Keshanská nemoc, endemická juvenilní kardiomyopatie vyskytující se v provincii Keshan v Číně, kde byl zjištěn denní příjem selenu méně než 10 µg/osobu/den. Nedostatek selenu se v patologii této choroby kombinuje s infekcí virem Coxsackie B3. Zdá se, že virus silně zvyšuje svoji virulenci při pasáži přes hostitele s deficiencí selenu [68]. Nízké hladiny selenu jsou nacházeny u kriticky nemocných pacientů, klinické studie však většinou neprokázaly významné zlepšení stavu těchto pacientů po suplementaci selenem [69]. Podobná situace je popisována i ve vztahu selenu a onemocnění AIDS [70]. Nízké hladiny selenu dále ovlivňují rovnováhu hormonů štítné žlázy. V extrémní podobě vede kombinovaný nedostatek selenu a jódu k vývoji myxedematózního kreténismu, existuje však podezření, že i mírný nedostatek selenu může způsobit vznik a vývoj autoimunitního onemocnění štítné žlázy u geneticky predisponovaných jedinců [71].

2.9. Selen a nádorová onemocnění

V šedesátých a sedmdesátých letech minulého století se objevily první zprávy o tom, že nízký obsah selenu v dietě zřejmě koreluje s vyšším výskytem nádorových onemocnění [72, 73]. První intervenční studie, které udávaly statisticky významné snížení incidence nádorových onemocnění v souvislosti se suplementací selenem, byly provedeny v letech 1985 – 1991 v Číně [74, 75], protože však selen byl podáván spolu s dalšími látkami a studovaná populace byla podvyživená, je třeba interpretovat závěry těchto studií s jistou opatrností [76].

Za významný mezník je považována studie nazvaná Nutritional Prevention of Cancer Trial, která proběhla na přelomu 80. a 90. let minulého století v USA. Byla to randomizovaná dvojité zaslepená studie, zaměřená primárně na prevenci rekurence nádorů kůže. Účastníci studie dostávali 200 µg selenu/den ve formě selenem obohacených kvasnic. Studie nepotvrdila vliv suplementace selenu na výskyt rakoviny kůže, avšak další analýzy ukázaly významné snížení výskytu nádorů prostaty, plic a tlustého střeva [77, 78]. Při hodnocení výsledků této studie je třeba mít na paměti, že k významnému snížení výskytu nádorů došlo hlavně u té části souboru, u níž byly počáteční hladiny selenu nízké [79].

Ze zprávy připravované v roce 2005 pro FDA vyplynulo, že ze 36 studií, provedených do té doby s cílem prokázat souvislost mezi hladinou selenu a výskytem nádorů, přibližně polovina tuto souvislost potvrdila. Největší konzistence byla zjištěna v případě rakoviny prsu a prostaty [80]. Od té doby proběhla řada dalších studií, z nichž opět některé prokázaly příznivý vliv selenu, jiné však nikoli [61, 79].

Jedna z nejrozsáhlejších intervenčních studií byla zahájena v roce 2001 v USA. Tato randomizovaná, prospektivní, dvojitě zaslepená studie dostala název SELECT (Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial) a zúčastnilo se jí 35 533 zdravých mužů. Studie byla zaměřena primárně na prevenci vzniku rakoviny prostaty, vedlejší výstupy zahrnovaly rakovinu plic, střeva a další onemocnění. Selen byl podáván v množství 200 µg L-selenomethioninu denně, samostatně nebo v kombinaci s vitamínem E [81]. Studie měla původně trvat až 12 let, byla však ukončena po sedmi letech (v roce 2008), protože průběžné výsledky neprokázaly žádný preventivní účinek selenu ani vitamínu E, včetně jejich kombinace, na žádný plánovaný primární ani sekundární výstup [82].

Celá řada studií se také týkala vlivu selenu na výskyt a patogenezi kolorektálního karcinomu. Rané studie obvykle zahrnovaly poměrně malé soubory, např. Clark et al. sledovali výskyt adenomatózních polypů tlustého střeva a rekta v závislosti na koncentraci selenu v plazmě v souboru 48 mužů, u nichž zjistili statisticky významný vztah mezi nižší hladinou selenu v plazmě a výskytem jednoho nebo více polypů ve střevě [83]. Podobně Russo et al. zjistili u souboru 73 jedinců, že nízké plazmatické hladiny selenu jsou spojeny s vyšším výskytem mnohočetných adenomů, ne však s jejich velikostí nebo lokalizací [84]. Naopak Nelson et al. u svého souboru 138 kontrol, 139 pacientů s adenomem a 25 pacientů s karcinomem střeva nezjistili žádný vztah mezi množstvím selenu v séru a výskytem těchto benigních nebo maligních nádorů [85]. Ghadirian et al. analyzovali soubor 501 pacientů s nádory střeva, prsu nebo prostaty a 202 zdravých jedinců. Zjistili, že výskyt rakoviny tlustého střeva je vyšší u pacientů s nižším obsahem selenu v nehtech, neprokázali však tento vztah v případě rakoviny prsu a prostaty [86]. Early et al. shromáždili soubor 33 pacientů s kolorektálním karcinomem, 35 pacientů s adenomatózními polypy a 17 kolonoskopicky negativních jedinců. Nezjistili žádný rozdíl mezi skupinami v množství selenu a selenoproteinu P v plazmě ani v aktivitě extracelulární glutathion peroxidázy

[87]. Fernandez-Banares et al. zjišťovali vztah mezi množstvím selenu v séru a přítomností velkých kolorektálních adenomů u lidí žijících v oblasti s nízkým množstvím selenu v půdě. Shromáždili soubor 28 pacientů s velkými sporadickými adenomatózními polypy, 24 pacientů s kolorektálním adenokarcinomem a 35 zdravých jedinců. U pacientů s adenomatózními polypy a adenokarcinomy zaznamenali významně snížené hladiny selenu [88]. Rovněž v dalším souboru 451 účastníků byla zjištěna souvislost mezi vyšší hladinou selenu v séru a nižším výskytem kolorektálních adenomů [89].

Další poznatky ohledně vztahu selenu a rizika rozvoje CRC byly získány ze studie, která analyzovala data shromážděná ze tří předchozích studií nazvaných Wheat Bran Fiber Trial, Polyp Prevention Trial a Polyp Prevention Study [90]. Tyto studie měly zjistit vliv vlákniny, nízkotučné diety a některých potravinových doplňků včetně vitamínu E, A a β -karotenu na rekurenci adenomu u pacientů s předchozím výskytem adenomu ve střevě. Protože byly k dispozici údaje o hladinách selenu u celkem 1763 pacientů těchto tří studií, bylo možné analyzovat vztah mezi hladinou selenu a rizikem rekurence adenomu. Výsledky skutečně prokázaly zvýšené riziko rekurence adenomu u pacientů s nižší koncentrací selenu v krvi.

Z intervenčních studií byla již zmíněna studie nazvaná Nutritional Prevention of Cancer Trial, z jejíhož pozdějšího vyhodnocení vyplynulo statisticky významné 58% snížení výskytu kolorektálního karcinomu u skupiny suplementované selenem ve srovnání s placebem [78]. Bohužel, rovněž již zmiňovaná rozsáhlá studie SELECT tento trend nepotvrdila [82].

2.10. Předpokládané mechanismy protinádorového působení selenu

Protinádorové účinky selenu jsou závislé na typu a koncentraci použité sloučeniny. Základní množství selenu obsaženého v dietě by mělo pokrýt požadavky organismu na syntézu optimálního množství selenoproteinů. Mnohé selenoproteiny, jako glutathion peroxidáza, selenoprotein P nebo thioredoxin reduktáza hrají důležitou roli v antioxidačních reakcích a chrání buňky před poškozením reaktivními formami kyslíku. Vzhledem k tomu, že oxidativní stres je považován za jeden z hlavních faktorů přispívajících ke vzniku a rozvoji nádorového onemocnění, spočívá chemopreventivní

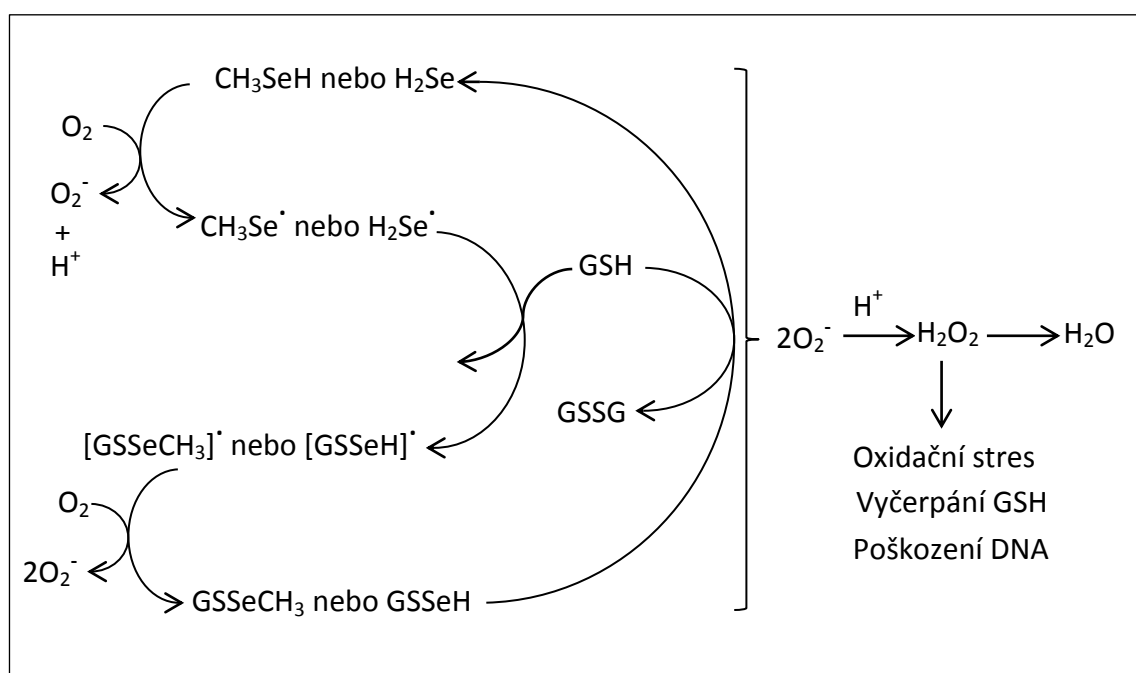
potenciál fyziologických dávek selenu právě v jeho antioxidačním působení prostřednictvím selenoproteinů. Snížené hladiny selenoproteinu P, hlavního selenoproteinu plazmy, jehož funkcí je transport selenu z jater do ostatních tkání, koreluje s vyšším rizikem vzniku nádorů [91]. Ztráta heterozygosity lokusu kódujícího glutathion peroxidázu-1 je běžnou událostí v patogenezi mnoha typů nádorů [92]. Poněkud obojetnou roli v tumorigenezi hraje thioredoxin reduktáza, jejíž exprese, na rozdíl od glutathion peroxidázy, bývá v nádorových buňkách zvýšena [93]. Velká pozornost je věnována studiu polymorfismů v genech pro selenoproteiny a jejich asociaci s různými nádorovými onemocněními [94]. Předpokládá se, že určité kombinace polymorfismů v genech pro selenoproteiny mohou reflektovat funkční interakce mezi těmito proteiny a ovlivňovat tak dostupnost selenu pro různé tkáně, schopnost udržovat redoxní rovnováhu a kontrolovat redoxní signalizaci [95].

Souvislost mezi sníženou hladinou selenoproteinů a rizikem vzniku nádorů byla rovněž studována na transgenních myších modelech, které v důsledku poruchy syntézy selenocysteinu vykazovaly významně snížené hladiny selenoproteinů, zejména glutathion peroxidázy-1 a thioredoxin reduktázy. Tyto myši jsou významně citlivější ke karcinogenezi tlustého střeva vyvolané azoxymethanem (AOM), než izogenní kontrolní kmeny. Suplementace diety selenem snižovala u těchto transgenních myší počet prekancerózních lézí indukovaných AOM, hladiny selenoproteinů však byly zvýšeny jen mírně, což naznačuje, že kromě ovlivnění hladin selenoproteinů se v tomto modelu uplatňují i mechanismy chemoprevence na selenoproteinech nezávislé [96].

Sloučeniny selenu mají rovněž vliv na metabolismus karcinogenních látek. Řada studií *in vitro* a *in vivo* prokázala schopnost sloučenin selenu omezit tvorbu DNA adduktů indukovanou chemickými karcinogeny [97, 98]. Selen zvyšuje expresi genů pro biotransformační enzymy fáze II, naopak snižuje expresi genů biotransformačních enzymů fáze I. K enzymům fáze I se řadí systém cytochromu P450 zodpovědný za přeměnu chemických karcinogenů na reaktivní formy schopné poškodit DNA. Selen tedy může působit protektivně ve fázi iniciace nádoru tím, že omezuje tvorbu aktivních forem karcinogenů [99].

Při použití tzv. „supranutričních“ dávek (tj. netoxických dávek větších než jsou zapotřebí k zajištění maximální aktivity selenoproteinů) se uplatňuje spíše prooxidační působení selenu. Sloučeniny selenu jsou v buňkách přeměňovány na dva základní

metabolity: hydrogen selenid H_2Se a methylselenol CH_3SeH . Oba tyto metabolity vstupují do cyklu redoxních reakcí, což může vést až k vyčerpání buněčných zásob redukovaného glutathionu (GSH) a NADPH, tvorbě vysoce reaktivního selenodiglutathionu a zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), jako je superoxid $\text{O}_2^{\cdot -}$ a hydrogenperoxid H_2O_2 (Obr. 2-2).



Obr. 2-2 Redoxní cyklus metabolitů sloučenin selenu. CH_3SeH – methylselenol, H_2Se – hydroselenid, GSH – redukovaný glutathion, GSSG – oxidovaný glutathion. Podle [100].

Metabolity hydroselenidu a methylselenolu mohou reagovat s disulfidovými a thiolovými skupinami proteinů a modifikovat je za vzniku selenotrisulfidů, disulfidů a Se-adduktů [101]. Předpokládá se, že selen tak zasahuje do buněčné signalizace modifikací regulačních cysteinů různých enzymů a transkripčních faktorů. V katalytické podjednotce proteinkinázy C (PKC) způsobuje selen tvorbu intramolekulárních disulfidových můstků a tím PKC inaktivuje. Tato redoxní inaktivace PKC se spolupodílí na inhibici buněčné proliferace a indukci buněčné smrti [102]. Aktivita NF- κB , AP-1, JNK, kaspázy 3 a ASK1 jsou selenem rovněž inhibovány prostřednictvím redoxní regulace jejich cysteinových zbytků [103-106].

Ovlivnění buněčného cyklu a indukce apoptózy sloučeninami selenu byla popsána u řady typů nádorových buněk včetně nádorů prostaty, střeva, jater, leukémií

a lymfomů. Zdá se, že methylované sloučeniny selenu, které jsou metabolizovány přímo na methylselenol, způsobují zástavu buněčného cyklu v G1 fázi, zatímco seleničitan a selenocystein indukují spíše zástavu v S/G2-M fázích, spojenou s produkcí ROS a genotoxickými účinky [107]. Mechanismy indukce apoptózy selenem jsou velmi komplexní a zahrnují produkci ROS a buněčnou signalizaci [108, 109]. Selen v in vitro modelech aktivoval kinázy JNK1, ERK1/2, p38 MAPK a Akt a rovněž dráhu p53 a indukoval apoptózu za účasti kaspáz i buněčnou smrt na kaspázách nezávislou [110-118].

Charakteristickou vlastností maligních nádorů, která je činí tak zhoubnými pro pacienta, je jejich schopnost šířit se po organismu a vytvářet metastázy. Ve studiích s pokusnými zvířaty bylo prokázáno, že sloučeniny selenu inhibují růst sekundárních nádorových ložisek [119]. Se-methyl-selenocystein ovlivňoval expresi kolagenu v buňkách nádoru prostaty [120] a selenomethionin sekreci matrixových metalloproteináz [121]. Selen rovněž inhiboval neoangiogenezi v nádorech vzniklých z xenotransplantátů nádorových buněk prostaty [122].

Z hlediska chemopreventivního působení selenu je dále velmi významné zjištění, že nádorové buňky mohou být citlivější k působení sloučenin selenu než jejich normální protějšky. Husbeck a kol. porovnávali buňky nádorů prostaty a odpovídající normální buňky odebrané pacientům a zjistili, že nádorové buňky byly citlivější k působení seleničitanu, nikoli však k selenomethioninu. Vyšší odolnost normálních buněk byla způsobena vyšší expresí mitochondriální superoxid dismutázy v těchto buňkách [123]. V buněčném modelu karcinomu plic byly buňky rezistentní k doxorubicinu citlivější k působení seleničitanu než buňky k doxorubicinu citlivé, což souviselo s vyšší schopností doxorubicin-citlivých buněk po ovlivnění seleničitanem indukovat expresi thioredoxin reductázy [124]. V další podobné práci bylo prokázáno, že nádorové buňky rezistentní k působení cytostatik v důsledku zvýšené exprese proteinů MRP jsou citlivější k působení seleničitanu, neboť MRP komplexy vylučují z buněk cystein, který vytváří na povrchu buňky silně redukční prostředí a tak přispívá ke zvýšení transportu selenu do buňky [125]. Seleničitan sodný také prokázal schopnost obnovit citlivost buněk rakoviny prostaty na apoptózu indukovanou TRAIL, a to v koncentraci, ve které sám o sobě apoptózu nevyvolával. V těchto buňkách došlo v důsledku působení seleničitanu k aktivaci proteinu p53 a translokaci proteinu Bax do mitochondrií, což

obnovilo komunikaci mezi vnější a vnitřní drahou apoptózy [126]. V buněčném modelu kolorektálního karcinomu seleničitan sodný potencoval cytotoxické účinky cytostatik [127].

Z výše uvedených poznatků vyplývá, že sloučeniny selenu mají schopnost účinně zasahovat do buněčné signalizace a metabolismu, ovlivňovat proliferaci nádorových buněk, transformaci karcinogenních látek a schopnost lidského organismu udržovat redoxní homeostázu. Mechanismy působení těchto sloučenin jsou komplexní a závisí na chemické formě zkoumané látky, její koncentraci a také na typu biologického modelu. Podrobnější výzkum účinků sloučenin selenu v různých buněčných modelech *in vitro* může přinést nové poznatky o mechanismu jejich působení a přispět tak k jejich budoucímu využití v klinických aplikacích.

3. CÍLE PRÁCE

V rámci této práce jsme si stanovili následující cíle:

1. Zjistit citlivost buněk linií lidského kolorektálního karcinomu HCT 116 a HCT 116-p53KO na působení seleničitanu sodného. Najít koncentrační rozmezí, ve kterém seleničitan sodný ovlivňuje buněčnou proliferaci a indukuje buněčnou smrt u těchto linií.
2. Podrobněji popsat mechanismus antiproliferativního účinku seleničitanu sodného s ohledem na buněčný cyklus.
3. Podrobněji popsat mechanismus buněčné smrti indukované seleničitanem sodným.
4. Zjistit, zda nepřítomnost funkčního proteinu p53 ovlivňuje citlivost buněk HCT 116 na působení seleničitanu sodného.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Chemikálie

Beckman - Coulter:

7-amino-aktinomycin D (7-AAD), izotypová kontrola myší IgG značená FITC, protilátka proti cyklinu A2 značená FITC

Boehringer Mannheim-Roche:

5-(2,4-disulfonatofenyl)-3-(4-jodfenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2*H*-tetrazolium (WST-1), Cell Proliferation Elisa BrDU Kit, Complete™ Mini Tablets

Calbiochem:

MnIII Tetrakis(1-methyl-4-pyridyl) porfyrin pentachlorid (MnTMPyP), pifithrin- α , myší monoklonální protilátka proti fosforylované ATM (pSer¹⁹⁸¹)

Cell Signaling Technology:

králičí protilátka proti fosforylovanému H2A.X (pSer¹³⁹), myší monoklonální protilátka proti PCNA, myší monoklonální protilátka proti cyklinu D1, králičí protilátka proti LC3B

DAKO:

polyklonální prasečí proti-králičí protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou, polyklonální prasečí proti-myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou

GIBCO:

penicilin, streptomycin, trypsin/EDTA

Molecular Probes:

sekundární protilátky Alexa Fluor®, SlowFade® medium, Vybrant® FAM Caspase-3 and 7-Assay Kit for Flow Cytometry, MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator, MitoTracker® Green, Hoechst 33342

PAA Laboratories:

fetální bovinní sérum (FBS)

Santa Cruz Biotechnology, Inc.:

králičí protilátka proti cyklinu B1, králičí protilátka proti Cdc2 p34, myší monoklonální protilátka proti p21, myší monoklonální protilátka proti LAMP-1

Sigma-Aldrich:

4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI), bovinní sérový albumin (BSA), bromodeoxyuridin (BrDU), Coomassie Brilliant Blue, Dulbeccovo modifikované Eagleovo médium (DMEM), dimethylsulfoxid (DMSO), L-buthionin-sulfoximin (BSO), myší monoklonální protilátka proti β -aktinu, paraformaldehyd, odtučněné sušené mléko (non-fat dry milk), propidium jodid, ribonukleáza A, seleničitan sodný, Triton-X

Kvalita ostatních použitých chemikálií odpovídala nejvyšší analytické čistotě.

4.2. Spotřební materiál pro kultivaci buněk

Nunc (Roskilde, Denmark): plastové kultivační lahve 25 cm² a 75 cm², 96-jamkové mikrotitrační destičky.

Becton-Dickinson (New Jersey, USA): plastové kultivační lahve 12,5 cm²

Hettich (Tuttlingen, Germany): cytospinové komůrky

4.3. Buňky a jejich kultivace

Buňky lidského kolorektálního karcinomu linie HCT 116 byly zakoupeny prostřednictvím American Type Culture Collection (ATCC N^o CCL-247, Manassas, VA, USA), buňky linie HCT 116-p53 KO byly laskavě poskytnuty prof. B. Vogelsteinem z Johns Hopkins University v Baltimore. Linie byly kultivovány jako monolayer v médiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) s přidavkem 10 % fetálního bovinního séra, 100 U/ml penicilinu a 100 μ g/ml streptomycinu, při 37°C v atmosféře 5 % CO₂. Buňky byly pasážovány po dosažení 80 % konfluence 2x týdně pomocí 0,05 % trypsinu/0,53 mM EDTA. Kultury byly pravidelně testovány na přítomnost mykoplazmat.

4.4. Testy v mikrotitračních destičkách

4.4.1. Nasazení buněk a ovlivnění seleničitanem sodným

Buňky v logaritmické fázi růstu byly převedeny do suspenze pomocí 0,05 % roztoku trypsinu/0.53 mM EDTA, resuspendovány v kultivačním mediu, nasazeny do 96-jamkových mikrotitračních destiček v hustotě 6 x 10³ buněk ve 200 μ l média na

jamku a kultivovány po dobu 24 h v inkubátoru při 37°C v atmosféře s 5 % CO₂. První sloupec destičky nebyl osazován buňkami a sloužil jako slepý pokus. Po 24-hodinové inkubaci bylo médium v jamkách vyměněno za 200 µl čerstvého média v případě kontrolních vzorků nebo za 200 µl média obsahujícího seleničitan sodný a buňky byly kultivovány v inkubátoru po dobu dalších 24 resp. 48 h.

4.4.2. Test metabolické aktivity (WST-1) a stanovení celkového množství proteinů v buňkách (Coomassie Brilliant Blue)

Pro stanovení metabolické aktivity buněk jsme postupovali podle pokynů výrobce (Cell proliferation reagent WST-1, Boehringer Mannheim-Roche), celkové množství proteinů jsme stanovili postupem podle Bradfordové [128]. Po uplynutí doby ovlivnění byly kontrolní a ovlivněné buňky v mikrotitračních destičkách 2x opláchnuty PBS a do jamek bylo přidáno 100 µl WST-1 v médiu (0,3 mg/ml). Absorbance byla měřena při 450 nm proti 650 nm (Spektrofotometr SpektraFluor Plus, Tecan, Salzburg, Austria). Poté byly destičky umístěny do inkubátoru a měření bylo opakováno po 2 h. Po měření byly kultury 2x opláchnuty PBS a fixovány roztokem ve složení 50 % etanol, 49 % H₂O a 1 % ledová kyselina octová. Buňky byly barveny roztokem Coomassie Brilliant Blue v koncentraci 0.4 mg/ml po dobu 1 h. Poté byly opláchnuty roztokem ve složení 85 % destilovaná voda, 10 % absolutní etanol, 5 % ledová kyselina octová. Navázané barvivo bylo rozpuštěno přidáním 100 µl desorpčního roztoku na jamku (98 mg octanu draselného, 700 ml etanolu a 300 ml H₂O) za mírného třepání po dobu 1 h. Absorbance byla měřena při 620 nm proti 450 nm (Spektrofotometr SpektraFluor Plus, Tecan, Salzburg, Austria).

4.4.3. Test DNA syntézy

Pro stanovení intenzity DNA syntézy jsme postupovali podle pokynů výrobce kitu (Cell Proliferation ELISA, BrDU, Boehringer Mannheim-Roche). Buňky byly nasazeny do černých 96-jamkových mikrotitračních destiček s transparentním dnem v hustotě 6 x 10³ buněk na jamku ve 200 µl média a kultivovány po dobu 24 h v inkubátoru při 37°C v atmosféře s 5 % CO₂. Poté bylo médium v jamkách vyměněno za 200 µl čerstvého média v případě kontrolních vzorků nebo za 200 µl média obsahujícího seleničitan sodný a buňky byly kultivovány v inkubátoru po dobu dalších 24 resp. 48 h. Na poslední

čtyři hodiny inkubace bylo k buňkám přidáno 20 μ l roztoku BrDU o koncentraci 100 μ M. Poté následovaly tyto kroky: opláchnutí jamek 200 μ l PBS, fixace 70 % etanolem po dobu 5 min, opláchnutí PBS, inkubace se 100 μ l 2,3 M HCl po dobu 30 min, 2x opláchnutí 200 μ l PBS, inkubace s 200 μ l blokovacího činidla, 3x opláchnutí PBS, inkubace s 50 μ l roztoku Anti-BrDU-POD po dobu 2 h, 3x opláchnutí PBS po 5 min a nakonec inkubace se 100 μ l chemiluminiscenčního ELISA substrátu po dobu 3 min za mírného třepání. Chemiluminescence byla měřena na spektrofotometru SpektraFluor Plus (Tecan, Salzburg, Austria). Při všech měřeních byl použit integrační čas 1000 ms a gain 130.

4.5. Časoběrná videomikroskopie

Buňky byly nasazeny do 12,5 cm² kultivačních lahví v hustotě 1,5 x 10⁵ buněk v 5 ml média a kultivovány po dobu 24 h v inkubátoru při 37°C v atmosféře s 5 % CO₂. Poté bylo médium vyměněno za 5 ml čerstvého média v případě kontrolních vzorků nebo za 5 ml média obsahujícího seleničitan sodný v koncentracích 2,5 μ M, 5 μ M a 10 μ M. Po výměně média byly buňky ponechány 20 min v inkubátoru a poté umístěny na stolek invertovaného mikroskopu v prostoru s teplotou 37°C (Invertovaný mikroskop Olympus IX-70, Olympus Optical Co, Ltd., Tokyo, Japan opatřený kamerou Mitsubishi CCD-100E, Mitsubishi Corporation, Tokyo, Japan). Po dobu 72 h bylo snímáno vybrané reprezentativní zorné pole v režimu 480, zpomalení 160. Časoběrné sekvence byly převedeny do digitální formy pomocí programu Adobe Premiere 6.0 a analyzovány.

4.6. Průtoková cytometrie

4.6.1. Analýza buněčného cyklu metodou kombinovaného barvení anti-cyklin A2/7-AAD

Postupovali jsme podle doporučení výrobce protilátky proti cyklinu A2 (Beckman Coulter). Buňky byly nasazeny do 25 cm² kultivačních lahví v hustotě 3 x 10⁵ buněk v 10 ml média a kultivovány po dobu 24 h v inkubátoru při 37°C v atmosféře s 5 % CO₂. Poté bylo médium vyměněno za 10 ml čerstvého média v případě kontrolních vzorků nebo za 10 ml média obsahujícího seleničitan sodný v koncentracích 2,5 μ M, 5 μ M a

10 μ M a buňky byly dále kultivovány po dobu 24 resp. 48 h. Kontrolní a ovlivněné buňky byly převedeny do suspenze pomocí 0,05 % trypsinu/0.53 mM EDTA a centrifugovány při 1000 rpm a 4°C po dobu 10 min, opláchnuty PBS a fixovány ledovým metanolem po dobu 10 min. Alikvoty 5×10^5 buněk byly přeneseny do mikrozkušavek, opláchnuty 1 ml PBS + 5 % BSA, resuspendovány ve 100 μ l PBS + 5 % BSA a inkubovány s 20 μ l anti-cyclin A2-FITC (nebo 20 μ l izotypové kontroly - myší IgG1-FITC) a 20 μ l 7-AAD po dobu 60 min při pokojové teplotě ve tmě. Poté byly vzorky opláchnuty 1 ml PBS + 5 % BSA, resuspendovány v 500 μ l PBS + 5 % BSA a analyzovány na průtokovém cytometru Cell Lab Quanta SC MPL Flow Cytometer (Beckman Coulter, USA) s argonovým laserem 488 nm ve FL1 kanálu pro detekci FITC a v kanálu FL3 pro detekci 7-AAD.

4.6.2. Stanovení sub G1 frakce buněčného cyklu

Použili jsme modifikovaný postup podle Vindelovova [129]. Buňky byly nasazeny do 25 cm² kultivačních lahví v hustotě 3×10^5 buněk v 10 ml média a kultivovány po dobu 24 h v inkubátoru při 37°C v atmosféře s 5 % CO₂. Poté bylo médium vyměněno za 10 ml čerstvého média v případě kontrolních vzorků nebo za 10 ml média obsahujícího seleničitan sodný v koncentracích 2,5 μ M, 5 μ M a 10 μ M a buňky byly dále kultivovány po dobu 24 resp. 48 h. Kontrolní a ovlivněné buňky byly převedeny do suspenze pomocí 0,05 % trypsinu/0.53 mM EDTA a resuspendovány v čerstvém médiu. Původní médium bylo před trypsinováním odebráno a poté přidáno k resuspendovaným buňkám, abych nedošlo ke ztrátě plovoucích buněk. Vzorky byly zcentrifugovány při 1000 rpm a 4°C po dobu 10 min, opláchnuty PBS a fixovány 2 ml ledového 70 % etanolu za mírného vortexování. Fixované vzorky byly uloženy při 4°C přes noc. Poté byly buňky opláchnuty PBS a jejich hustota upravena na 1×10^6 buněk/ml vzorku. Buňky byly inkubovány s 0,5 ml fosfát-citrátového pufru (0.2 M Na₂HPO₄, 0.1 M citrát, pH 7.8) po dobu 5 min, opláchnuty PBS a inkubovány s 0,5 ml Vindelovova roztoku (1.2 g/l TRIS, 0.6 g/l NaCl, 0.01 g/l RNáza a 0.05 g/l propidium jodid) po dobu 1 h při 37°C ve tmě. Poté byly vzorky analyzovány na průtokovém cytometru Cell Lab Quanta SC MPL Flow Cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) s argonovým laserem 488 nm ve FL2 kanálu.

4.6.3. Detekce aktivních kaspáz 3 a 7 pomocí průtokové cytometrie

Postupovali jsme podle doporučení výrobce kitu (Vybrant® FAM Caspase-3 and 7- Assay Kit for Flow Cytometry, Molecular Probes). Buňky byly nasazeny do 25 cm² kultivačních lahví v hustotě 3 x 10⁵ buněk v 10 ml média a kultivovány po dobu 24 h v inkubátoru při 37°C v atmosféře s 5 % CO₂. Poté bylo médium vyměněno za 10 ml čerstvého média v případě kontrolních vzorků nebo za 10 ml média obsahujícího seleničitan sodný v koncentraci 10 μM a buňky byly dále kultivovány po dobu 6–24 h. Kontrolní a ovlivněné buňky byly převedeny do suspenze pomocí 0,05 % trypsinu/0.53 mM EDTA a resuspendovány v čerstvém médiu. Původní médium bylo před trypsinováním slito a poté přidáno k resuspendovaným buňkám, aby nedošlo ke ztrátě plovoucích buněk. Hustota buněčné suspenze byla upravena na 1 x 10⁶ buněk/ml. K 300 μl této suspenze bylo přidáno 10 μl roztoku FLICA (fluorescenční inhibitor kaspáz) připraveného podle pokynů výrobce (Vybrant® FAM Caspase-3 and 7- Assay Kit for Flow Cytometry, Molecular Probes) a buňky byly kultivovány v inkubátoru při 37°C v atmosféře 5 % CO₂ po dobu 1 h. Během inkubace byly vzorky 3x krátce protřepány. Po skončení inkubace byly vzorky centrifugovány při 1000 rpm a 20°C po dobu 10 min, 2x propláchnuty 1 ml promývacího pufru (dodaného výrobcem jako součást kitu), resuspendovány ve 400 μl promývacího pufru a analyzovány na průtokovém cytometru Cell Lab Quanta SC MPL Flow Cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) s argonovým laserem 488 nm ve FL1 kanálu.

4.6.4 Vliv pifithrinu-α na aktivaci kaspáz po ovlivnění seleničitanem sodným

Buňky byly nasazeny do 25 cm² ml kultivačních lahví v hustotě 3 x 10⁵ buněk v 10 ml média a kultivovány po dobu 24 h v inkubátoru při 37°C v atmosféře s 5% CO₂. Poté bylo médium vyměněno za 10 ml čerstvého média v případě kontrolních vzorků nebo za 10 ml média obsahujícího seleničitan sodný v koncentraci 10 μM, pifithrin-α v koncentraci 10 μM, případně kombinaci seleničitanu sodného a pifithrinu-α v uvedených koncentracích a buňky byly dále kultivovány po dobu 24 resp. 48 h. Vzorky byly dále zpracovány postupem uvedeným v bodu 4.6.3.

4.7. Detekce proteinů Western blottingem

Kontrolní a ovlivněné buňky byly převedeny do suspenze pomocí 0,05 % trypsinu/0.53 mM EDTA, opláchnuty PBS a centrifugovány při 1300 rpm a 4°C po dobu 10 min. Sediment byl resuspendován v 5 ml ledového lyzačního pufru (137 mmol NaCl, 10 % glycerol, 1 % n-oktyl- β -D-glukopyranosid, 50 mmol NaF, 20 mmol TRIS, 1 mmol ortovanadičitan sodný, Complete™ Mini 1 tbl). Lyzáty byly inkubovány 30 min na ledu, poté centrifugovány po dobu 30 min při 14000 rpm a 4°C. Supernatan byl slit do kryozkumavek a zamražen při -80°C.

Buněčné lyzáty byly zahřívány po dobu 5 min při 95° C v SDS vzorkovém pufru (TRIS-HCL pH 6.8, 2, β -merkaptoetanol, 10 % glycerol, SDS, 0,1 % bromfenolová modř) a poté naneseny na 15 % SDS/polakrylamidový gel. Každý vzorek lyzátu obsahoval stejné množství proteinu (40 μ g). Po skončení elektroforézy byly proteiny přeneseny na PVDF membránu (100 V, 250 mA, 60 min) a inkubovány při 25°C po dobu 1 h v roztoku obsahujícím 5 % odtučněné sušené mléko, 10 mmol TRIS-HCL pH 8, 150 mM NaCl a 0,1 % Tween 20 (TBST). Membrány byly inkubovány s primárními protilátkami (anti-PCNA 1:100, anti-p21 1:500, anti-cyklin D1, anti-cyklin B1, anti-Cdc2 p34, anti- β aktin, anti-LC3B, anti-LAMP1, anti-p53, anti-pH2A.X, anti-pATM 1:1000) při 4°C přes noc, opláchnuty 6x po 5 min TBST, inkubovány se sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidázou (polyklonální prasečí proti-králičí protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou nebo polyklonální prasečí proti-myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou 1 : 1000, 1 h, 25°C), opláchnuty 6x TBST a signál byl vyvolán pomocí chemiluminiscenčního (ECL) detekčního kitu (Boehringer, Mannheim-Roche, Basel, Switzerland). Jako nanášecí kontrola byl použit β -aktin. Intenzita proteinově specifických signálů v daných časových intervalech byla stanovena pomocí programu GelQuant 2.7 (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel) a byla vyjádřena v násobcích hodnoty zjištěné v čase 0 h.

4.8. Dynamické měření buněčné proliferace pomocí systému xCELLigence

4. 8. 1. Modulace účinků seleničitanu sodného prooxidantem (BSO) a anti-oxidantem (MnTMPyP)

Do každé jamky 16-jamkové E-destičky bylo napipetováno 90 μ l média a byla změřena základní hodnota impedance (pozadí) ve všech jamkách. Poté bylo do jamek přidáno 100 μ l buněčné suspenze v hustotě 5×10^4 buněk na jamku. Po 24-hodinové inkubaci v RTCA stanici bylo do jamek přidáno 10 μ l kultivačního média (kontrolní jamky) nebo 10 μ l média obsahujícího seleničitan sodný (výsledná koncentrace 10 μ M), BSO (výsledná koncentrace 100 μ M), MnTMPyP (výsledná koncentrace 5 μ M) a kombinace BSO + seleničitan sodný a MnTMPyP + seleničitan sodný v uvedených koncentracích. Buňky byly kultivovány v RTCA stanici po dobu dalších 48 h, hodnota buněčného indexu (impedance) byla snímána každou hodinu.

4.8.2. Modulace účinků seleničitanu sodného pifithrinem- α

Do každé jamky 16-jamkové E-destičky bylo napipetováno 90 μ l média a byla změřena základní hodnota impedance (pozadí) ve všech jamkách. Poté bylo do jamek přidáno 100 μ l buněčné suspenze v hustotě 5×10^4 buněk na jamku. Po 6-hodinové inkubaci v RTCA stanici bylo do jamek přidáno 10 μ l kultivačního média (kontrolní jamky) nebo 10 μ l média obsahujícího seleničitan sodný (výsledná koncentrace 10 μ M) nebo pifithrin- α (výsledná koncentrace 10 μ M) a kombinaci seleničitanu sodného a pifithrinu- α v uvedených koncentracích. Buňky byly kultivovány v RTCA stanici po dobu 48 h, hodnota buněčného indexu (impedance) byla snímána každou hodinu.

4.9. Fluorescenční mikroskopie

4.9.1. Detekce superoxidu v mitochondriích

Buňky byly nasazeny do cytospinových komůrek v hustotě 3×10^4 buněk v 1 ml média a kultivovány po dobu 24 h v inkubátoru při 37°C v atmosféře s 5 % CO₂. Poté bylo médium vyměněno za 1 ml čerstvého média v případě kontrolních vzorků nebo za

1 ml média obsahujícího seleničitan sodný v koncentraci 10 μM a buňky byly dále kultivovány po dobu 24 h. Po ukončení doby ovlivnění byly buňky opláchnuty PBS s přídavkem Ca^{2+} a Mg^{2+} iontů (37°C) a inkubovány s 1 ml média DMEM (37°C) obsahujícího MitoTracker® Green (0,1 $\mu\text{l/ml}$) a MitoSOX™ Red (5 μM). Poté byly buňky opláchnuty DMEM (37°C), dobarveny barvivem Hoechst 33342 (5 μM v DMEM) po dobu 5 min, opět opláchnuty DMEM (37°C), přikryty krycím sklem a pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse E 400 (Nikon Corporation, Kanagawa, Japan). Fotografie byly pořízeny pomocí programu LUCIA DI Image Analysis systém (Laboratory Imaging Ltd., Česká Republika) a analyzovány.

4.9.2 Imunofluorescenční detekce fosforylovaného histonu H2A.X

Buňky byly nasazeny do cytospinových komůrek v hustotě 3 x 10⁴ buněk v 1 ml média a kultivovány po dobu 24 h v inkubátoru při 37°C v atmosféře s 5 % CO₂. Poté bylo médium vyměněno za 1 ml čerstvého média v případě kontrolních vzorků nebo za 1 ml média obsahujícího seleničitan sodný v koncentraci 10 μM a buňky byly dále kultivovány po dobu 24 h. Kontrolní a ovlivněné buňky byly opláchnuty PBS, fixovány čerstvým paraformaldehydem (2 % v PBS) po dobu 15 min, opláchnuty 3x PBS a blokovány mlékem (5 % v PBS–T) po dobu 30 min při pokojové teplotě. Poté byly buňky inkubovány s primární protilátkou proti fosforylovanému histonu H2A.X v ředění 1:100 v mléku (5 % v PBS–T) při teplotě 4°C po dobu 1 h. Po skončení inkubace byly buňky 4x opláchnuty PBS a inkubovány se sekundární protilátkou (proti-králíčí Alexa Fluor® 488, ředění 1:250 v mléku - 5 % v PBS–T) po dobu 1 h při pokojové teplotě. Vzorky byly dobarveny barvivem DAPI v koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ po dobu 5 min, opláchnuty 3x PBS, zamontovány do SlowFade® média a pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse E 400 (Nikon Corporation, Kanagawa, Japan). Fotografie byly pořízeny pomocí programu LUCIA DI Image Analysis systém (Laboratory Imaging Ltd., Česká Republika) a analyzovány.

4.9.3. Detekce monodansylcadaverinu

Buňky byly nasazeny do cytospinových komůrek v hustotě 3 x 10⁴ buněk v 1 ml média a kultivovány po dobu 24 h v inkubátoru při 37°C v atmosféře s 5 % CO₂. Poté bylo médium vyměněno za 1 ml čerstvého média v případě kontrolních vzorků nebo za

1 ml média obsahujícího seleničitan sodný v koncentraci 10 μ M a buňky byly dále kultivovány po dobu 24 h. Po skončení inkubace bylo médium slito a nahrazeno čerstvým médiem s 50 μ M monodansylcadaverinu a vzorky byly inkubovány 60 min při 37°C ve tmě. Změny ve fluorescenci byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse E 400 (Nikon Corporation, Kanagawa, Japan). Fotografie byly pořízeny pomocí programu LUCIA DI Image Analysis systém (Laboratory Imaging Ltd., Česká Republika) a analyzovány.

4.10. Statistické vyhodnocení

Předkládané výsledky jsou průměrem ze tří nezávislých měření. Statistická analýza dat byla provedena statistickým programem GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Byl použit Anova test s následným hodnocením podle Dunetta či Bonferroniho (mnohočetný porovnávací test). Výsledky byly porovnávány s kontrolou, přičemž rozdíly byly považovány za signifikantní na hladině významnosti $p < 0,05$.

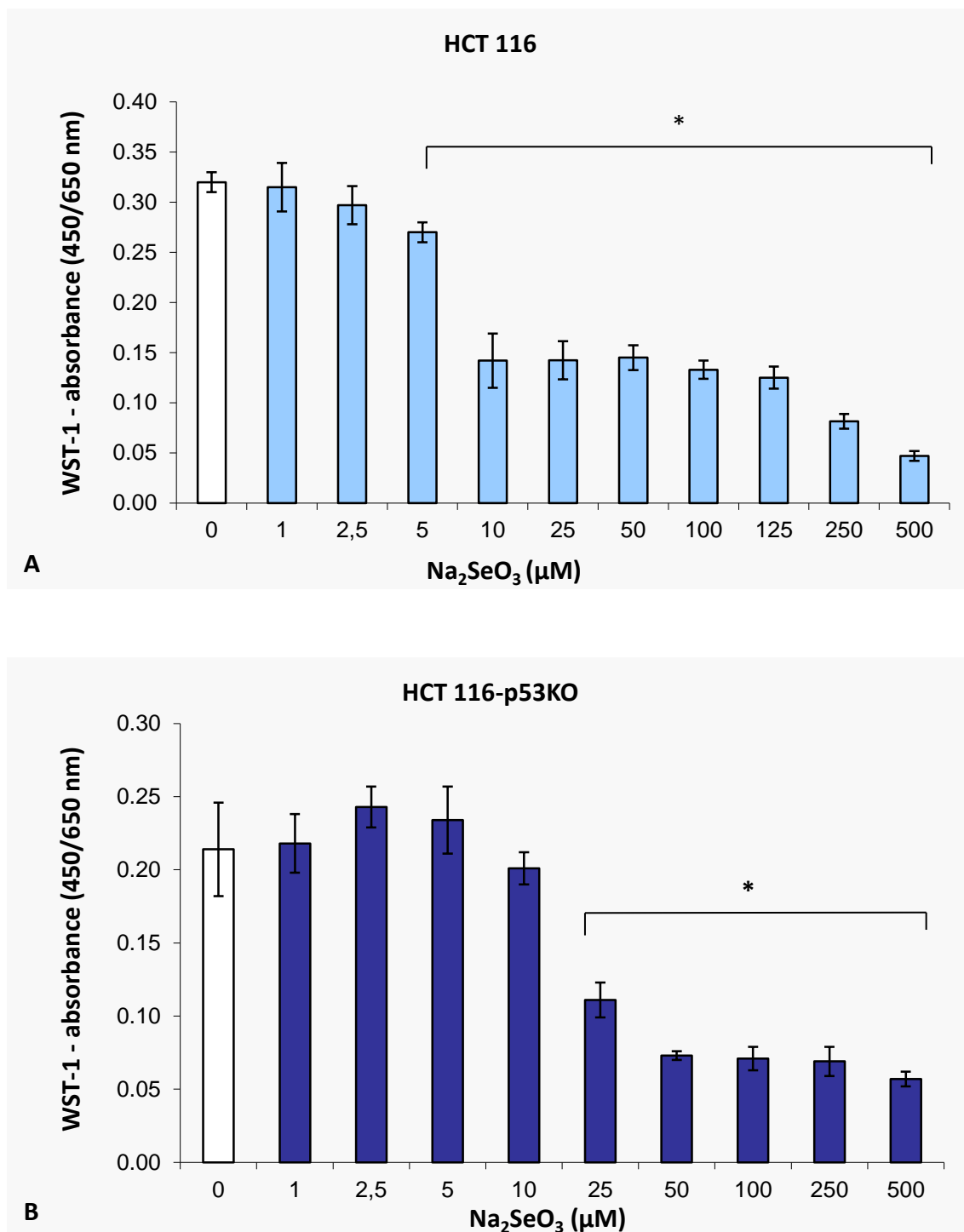
5. VÝSLEDKY

5.1. Metabolická aktivita a celkový obsah proteinů

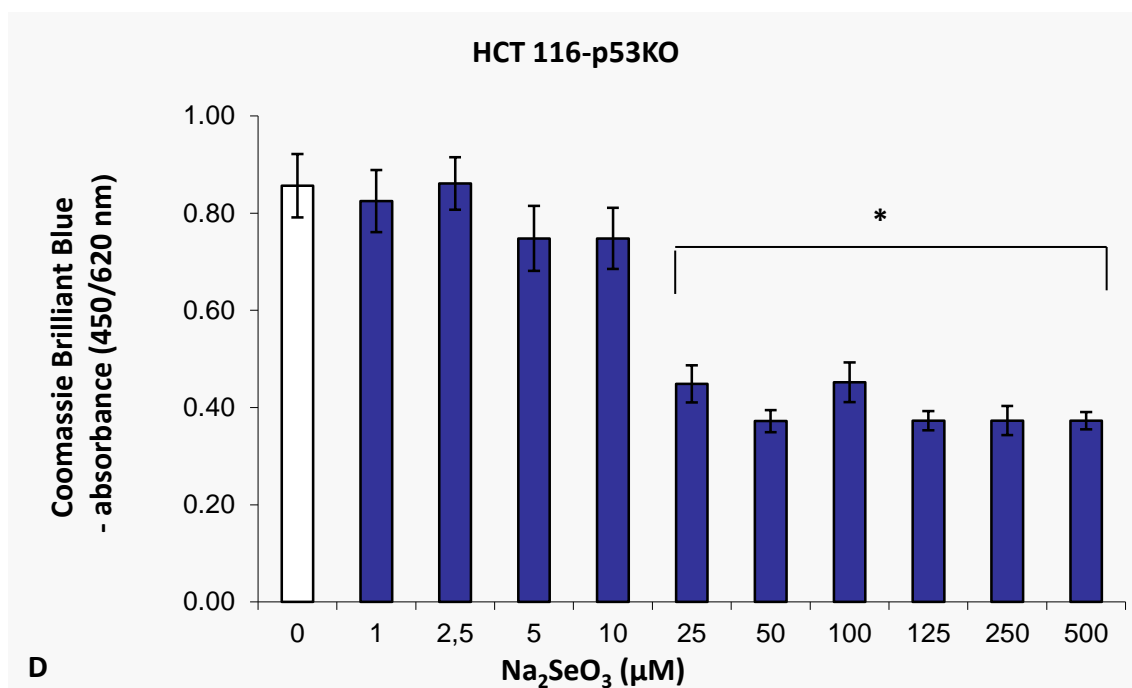
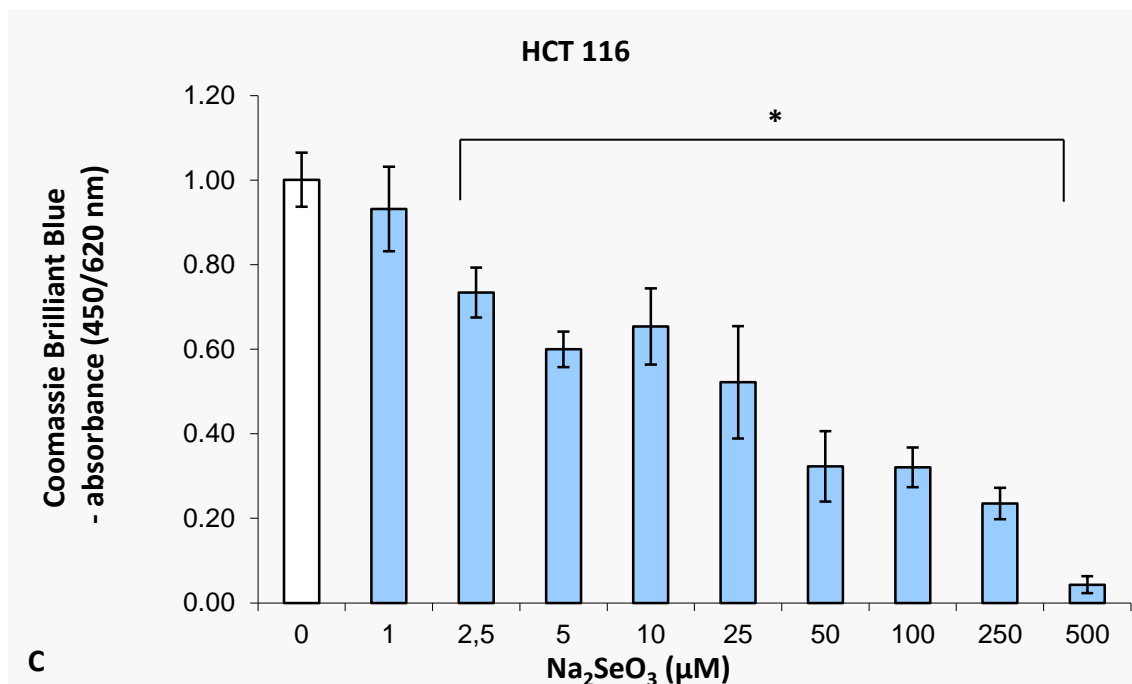
Účinek seleničitanu sodného na buňky linií HCT 116 a HCT 116-p53KO byl nejprve stanoven měřením metabolické aktivity testem WST-1 a dále měřením celkového obsahu proteinů metodou barvení Coomassie Brilliant Blue v průběhu 24 h (Obr. 5-1A-D). U buněk HCT 116 došlo ke snížení metabolické aktivity po působení seleničitanu sodného v koncentracích 10 μM a vyšších, ke snížení celkového obsahu proteinů od koncentrace 2,5 μM . Buňky HCT 116-p53KO byly méně citlivé k působení seleničitanu sodného, k významnému snížení metabolické aktivity a celkového obsahu proteinů u nich došlo až od koncentrace 25 μM této látky. Na základě těchto výsledků byly pro další testování zvoleny koncentrace 2,5 μM , 5 μM a 10 μM seleničitanu sodného.

5.2. Syntéza DNA

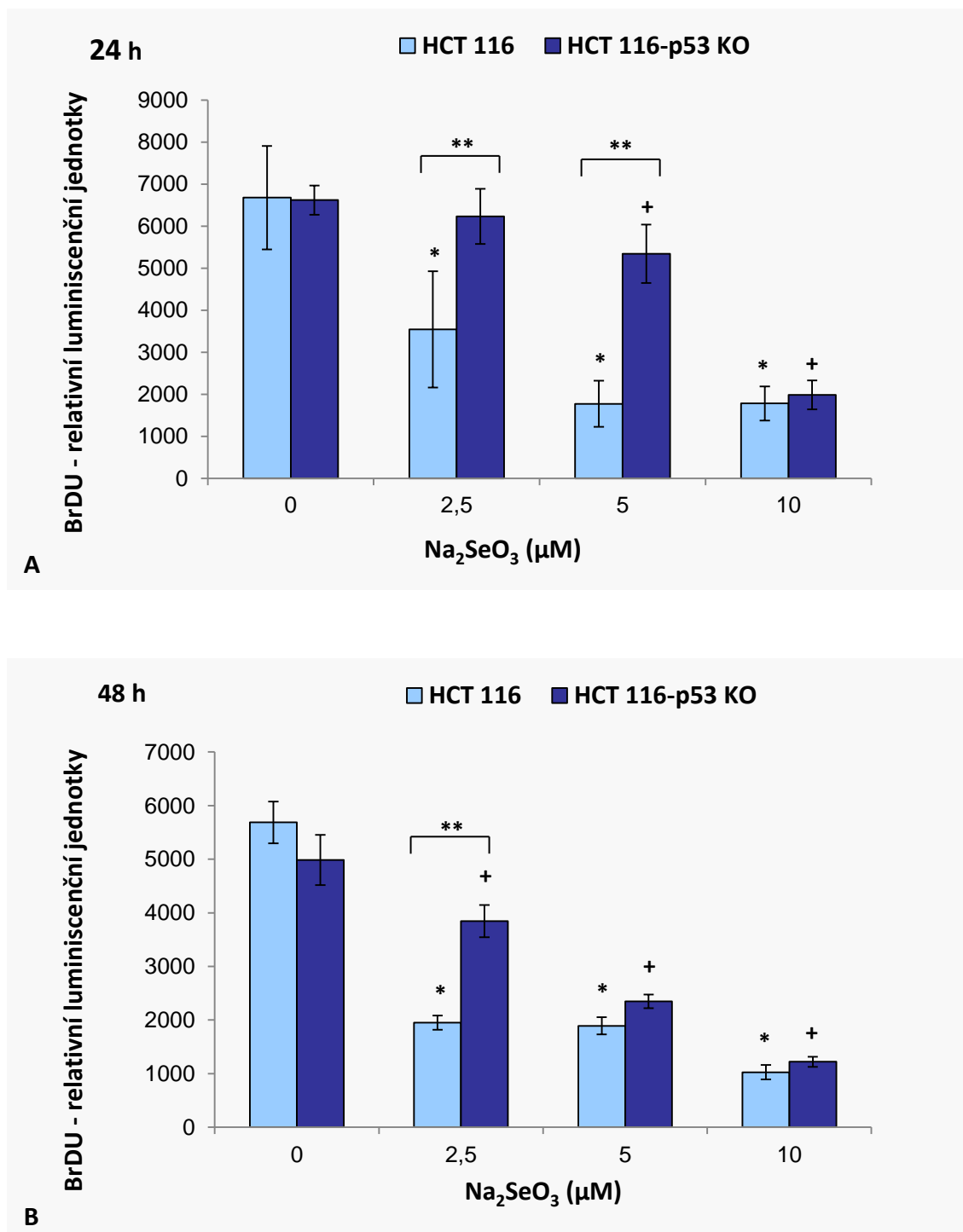
Vliv seleničitanu sodného na syntézu DNA u buněk HCT 116 a HCT 116-p53KO byl stanoven metodou inkorporace BrDU s chemiluminiscenční detekcí. Seleničitan sodný snižoval množství inkorporovaného BrDU u obou buněčných linií v závislosti na koncentraci a době působení. V intervalu 24 h došlo u linie HCT 116 k významnému poklesu množství inkorporovaného BrDU ve srovnání s kontrolním vzorkem již od koncentrace 2,5 μM seleničitanu sodného, u linie HCT 116-p53KO od koncentrace 5 μM seleničitanu sodného. V intervalu 48 h byla syntéza DNA významně snížena u obou linií od koncentrace 2,5 μM seleničitanu sodného. Inkorporace BrDU byla méně inhibována seleničitanem sodným u linie HCT 116-p53KO ve srovnání s linií HCT 116, statisticky významné rozdíly mezi liniemi byly zjištěny v obou časových intervalech v koncentracích 2,5 μM a 5 μM seleničitanu sodného, v koncentraci 10 μM tyto rozdíly vymizely (Obr. 5-2A,B).



Obr. 5-1A,B Metabolická aktivita buněk HCT 116 (A) a HCT 116-p53KO (B) ovlivněných seleničitanem sodným po dobu 24 h stanovená testem WST-1. * statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0.05$.



Obr. 5-1C,D Celkový obsah proteinů u buněk HCT 116 (C) a HCT 116-p53KO (D) ovlivněných seleničitanem sodným po dobu 24 h stanovený pomocí barvení Coomassie Brilliant Blue. * statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0.05$.



Obr. 5-2A,B Vliv seleničitanu sodného v koncentracích 2,5 μM, 5 μM a 10 μM na inkorporaci BrDU u linií HCT 116 a HCT 116-p53KO v intervalech 24 h (A) a 48 h (B).

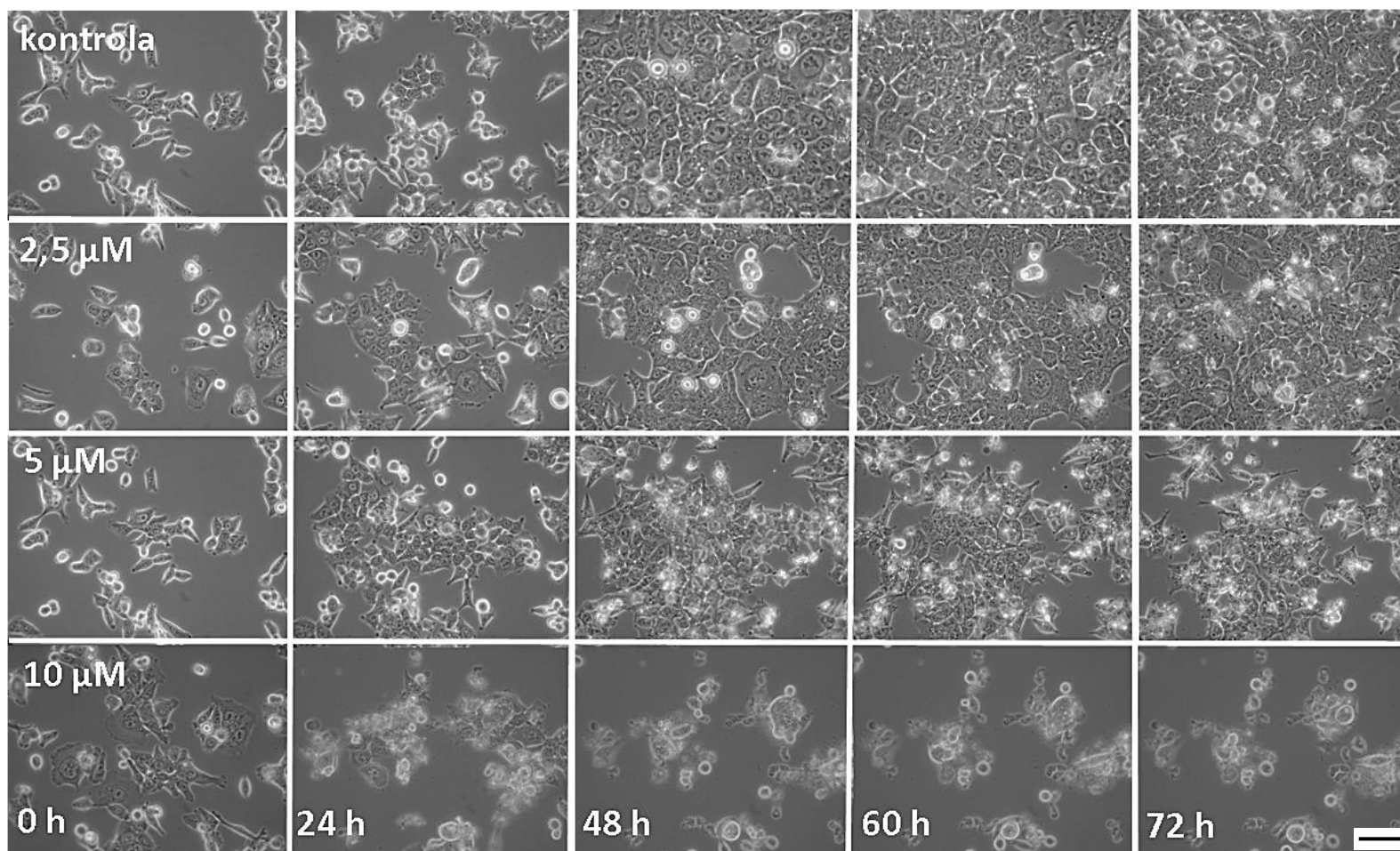
* statisticky významný rozdíl proti kontrole (HCT 116), + statisticky významný rozdíl proti kontrole (HCT 116-p53KO), ** statisticky významný rozdíl mezi liniemi HCT 116 a HCT 116-p53KO, $p < 0.05$.

5.3. Proliferace a morfologie buněk

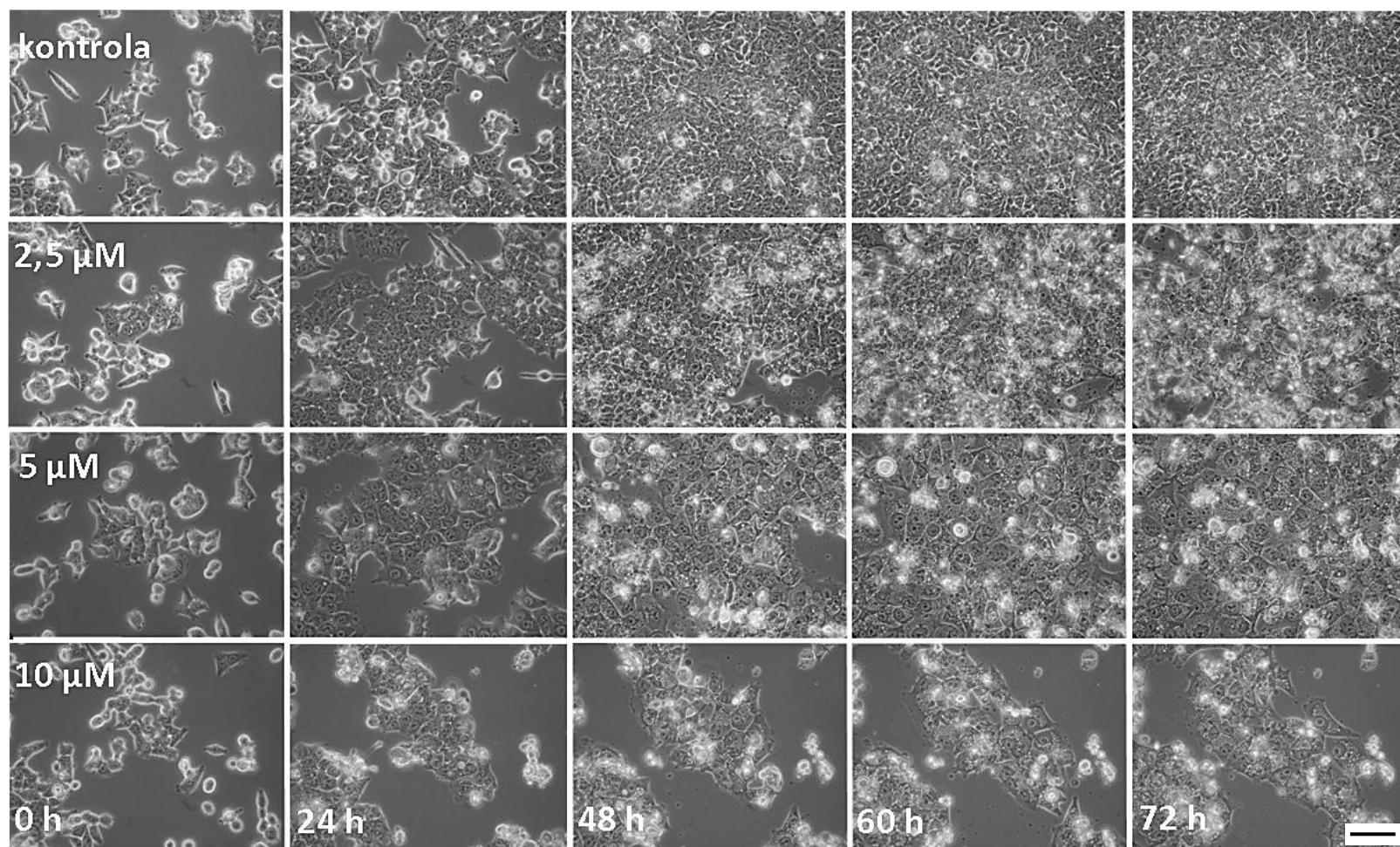
Buňky linií HCT 116 a HCT 116-p53KO kontrolní a ovlivněné seleničitanem sodným v koncentracích 2,5 μM , 5 μM a 10 μM byly časosběrně snímány po dobu 72 h (Obr. 5-3A,B). Buňky těchto linií jsou epiteloidní, s oválnými jádry a výraznými jadérky, proměnlivého tvaru a velikosti, což je vidět zejména při nízké hustotě kultury. Mají tendenci rozrůstat se ve shlucích a jsou schopné pohybu v kultuře. Jak je patrné z časosběrných snímků, kontrolní kultury obou linií při dané hustotě nasazení dosahují konfluence během 48 h kultivace. Seleničitan sodný inhiboval proliferaci obou buněčných linií v závislosti na koncentraci a době působení. V ovlivněných buňkách docházelo k tvorbě četných cytoplazmatických vakuol (viz též oddíl 5.12), buňky se zakulacovaly, odpojovaly od podkladu a vytvářely dynamicky se měnící výběžky cytoplazmy, tzv. „blebs“. Výrazný rozdíl v citlivosti obou linií byl patrný již v koncentraci 5 μM seleničitanu sodného. V koncentraci 10 μM seleničitan sodný výrazně omezil proliferaci linie HCT 116 během 24 h, zatímco buňky linie HCT 116-p53KO proliferovaly ještě nejméně v intervalu 48 hodin působení seleničitanu sodného.

5.4. Analýza buněčného cyklu metodou kombinovaného barvení anti-cyklin A2 /7-AAD

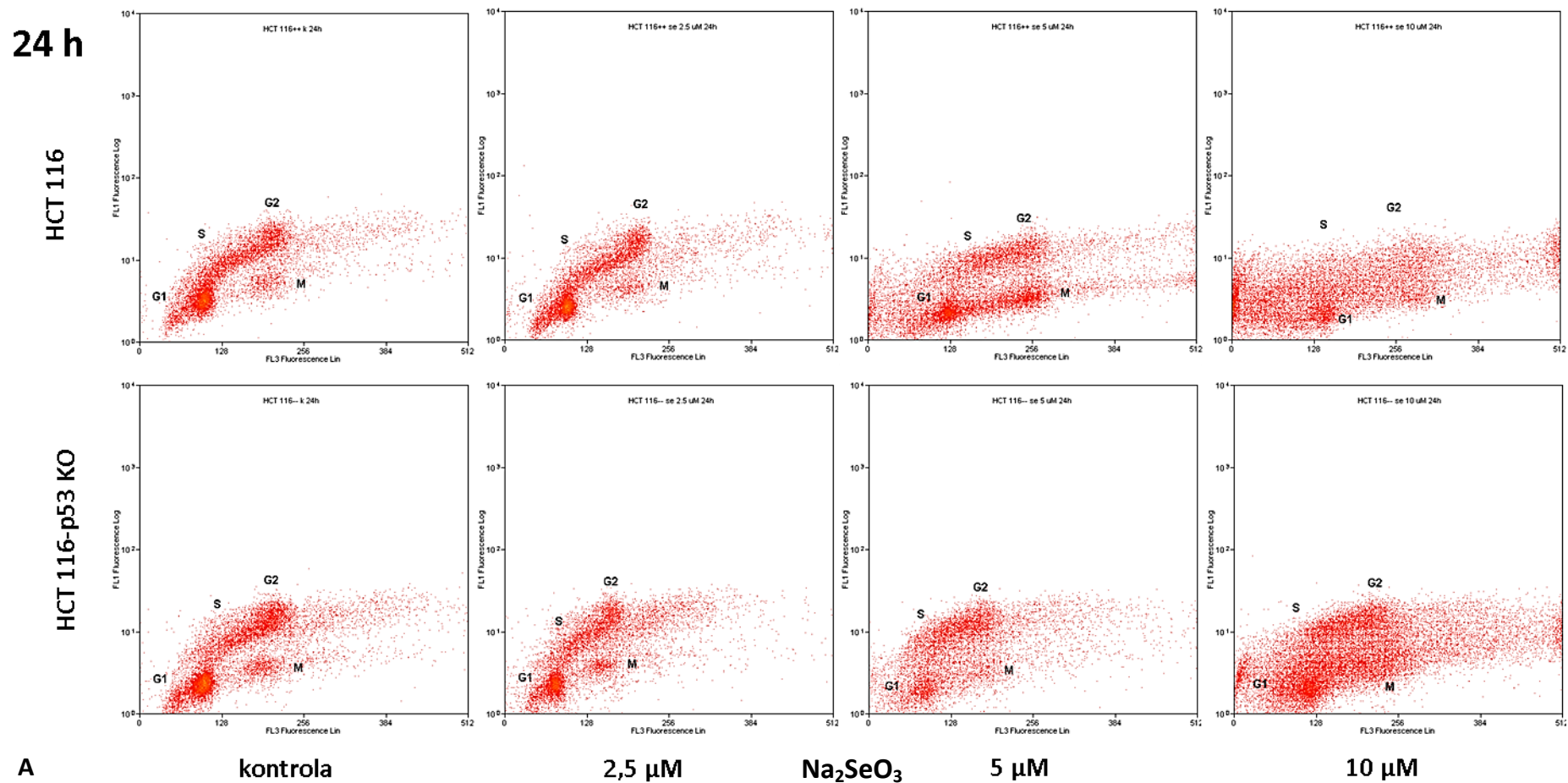
Vliv seleničitanu sodného na distribuci fází buněčného cyklu s ohledem na expresi cyklinu A2 u buněk linií HCT 116 a HCT 116-p53KO byl stanoven pomocí průtokové cytometrie. Exprese cyklinu A2 byla detekována pomocí fluorescenčně značené protilátky, DNA byla barvena 7-AAD (Obr. 5-4A,B). Ve srovnání s linií HCT 116 projevovaly buňky linie HCT 116-p53KO výraznější tendenci hromadit se v S/G2 fázích buněčného cyklu, což bylo patrné zejména v koncentracích 5 μM a 10 μM seleničitanu sodného. Statisticky významný rozdíl v procentu buněk pozitivních na cyklin A2 mezi liniemi HCT 116 a HCT 116-p53KO byl zjištěn v koncentracích 5 μM a 10 μM seleničitanu sodného v intervalu 24 h a 5 μM seleničitanu sodného v intervalu 48 h (obr. 5-4C,D).



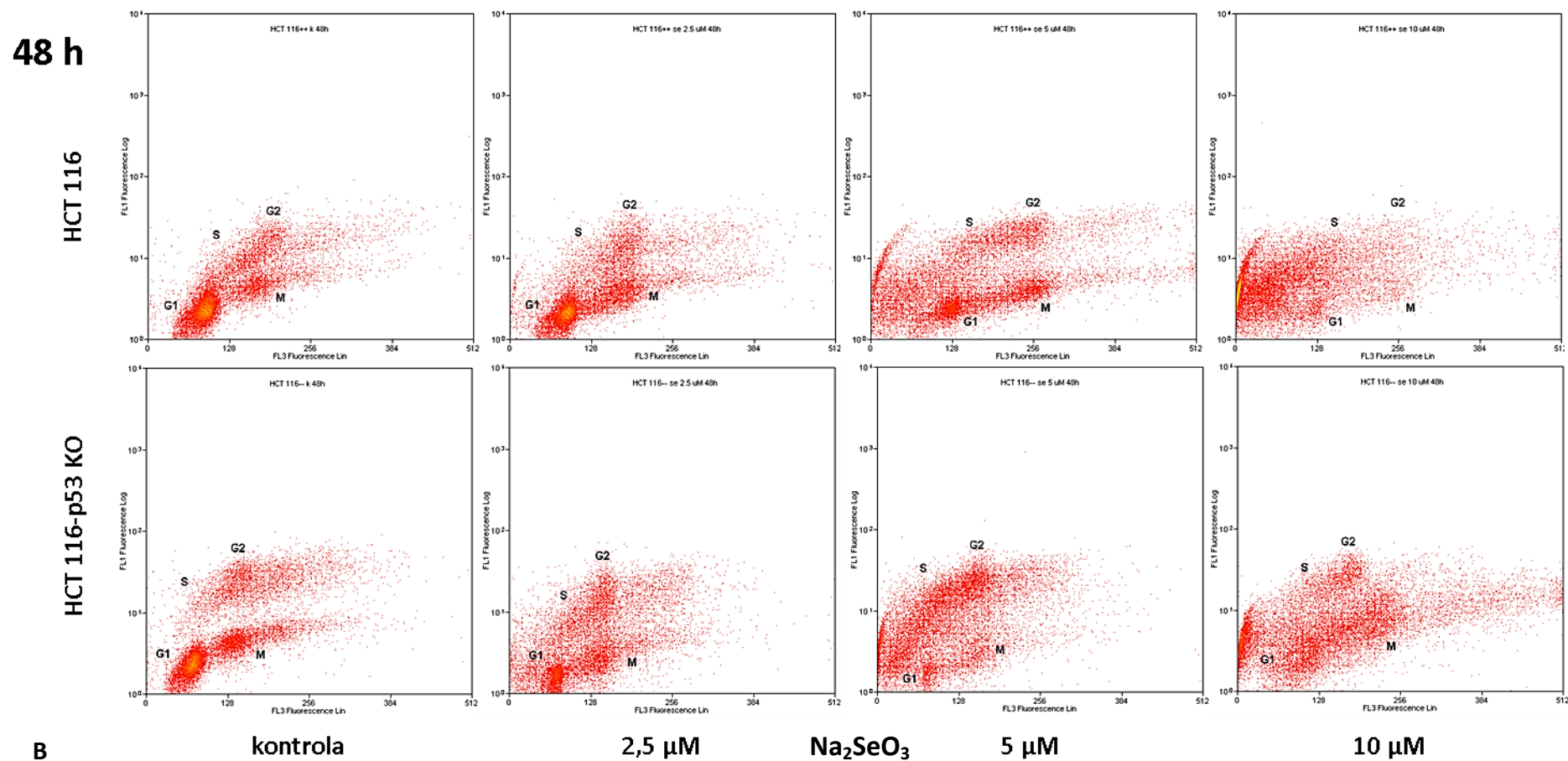
Obr. 5-3 A Proliferace buněk HCT 116 po ovlivnění seleničitanem sodným v koncentracích 2,5 μM , 5 μM a 10 μM v průběhu 72 h zaznamenaná metodou časosběrné mikroskopie. Měřítka - 100 μm .



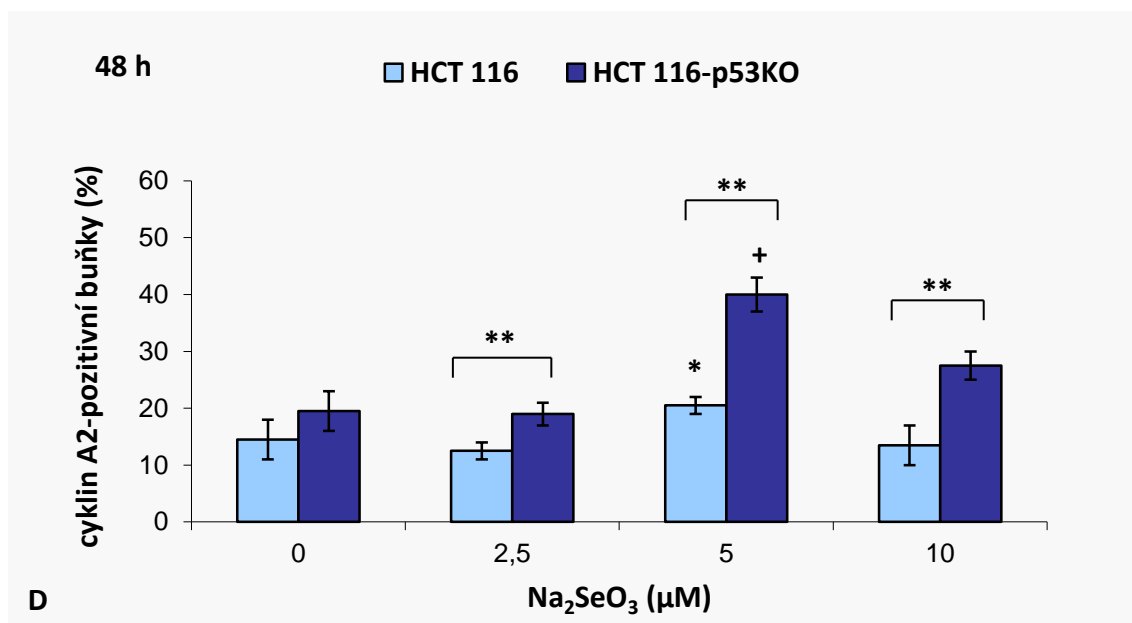
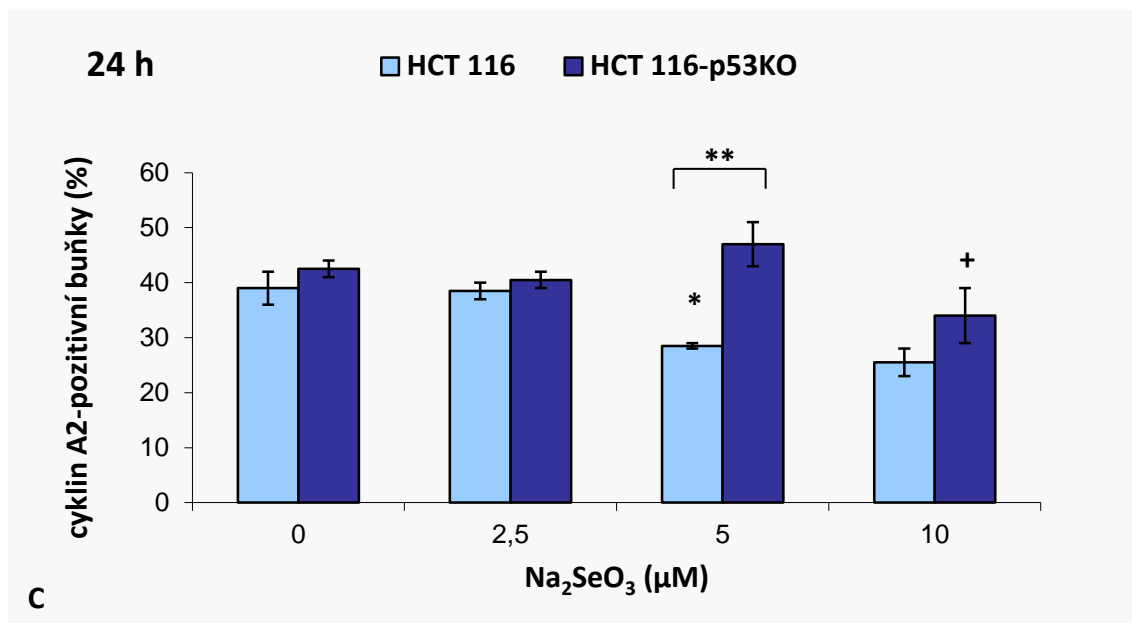
Obr. 5-3B Proliferace buněk HCT 116-p53KO po ovlivnění seleničitanem sodným v koncentracích 2,5 μM , 5 μM a 10 μM v průběhu 72 h zaznamenaná metodou časosběrné mikroskopie. Měřítka – 100 μm .



Obr. 5-4A Distribuce fází buněčného cyklu buněk HCT 116 a HCT 116-p53KO po ovlivnění seleničitanem sodným v koncentracích 2,5 μM , 5 μM a 10 μM v intervalu 24 h, analyzovaná pomocí kombinovaného barvení fluorescenčně značenou protilátkou proti cyklinu A2 (svislé osy) a propidium jodidem (vodorovné osy).



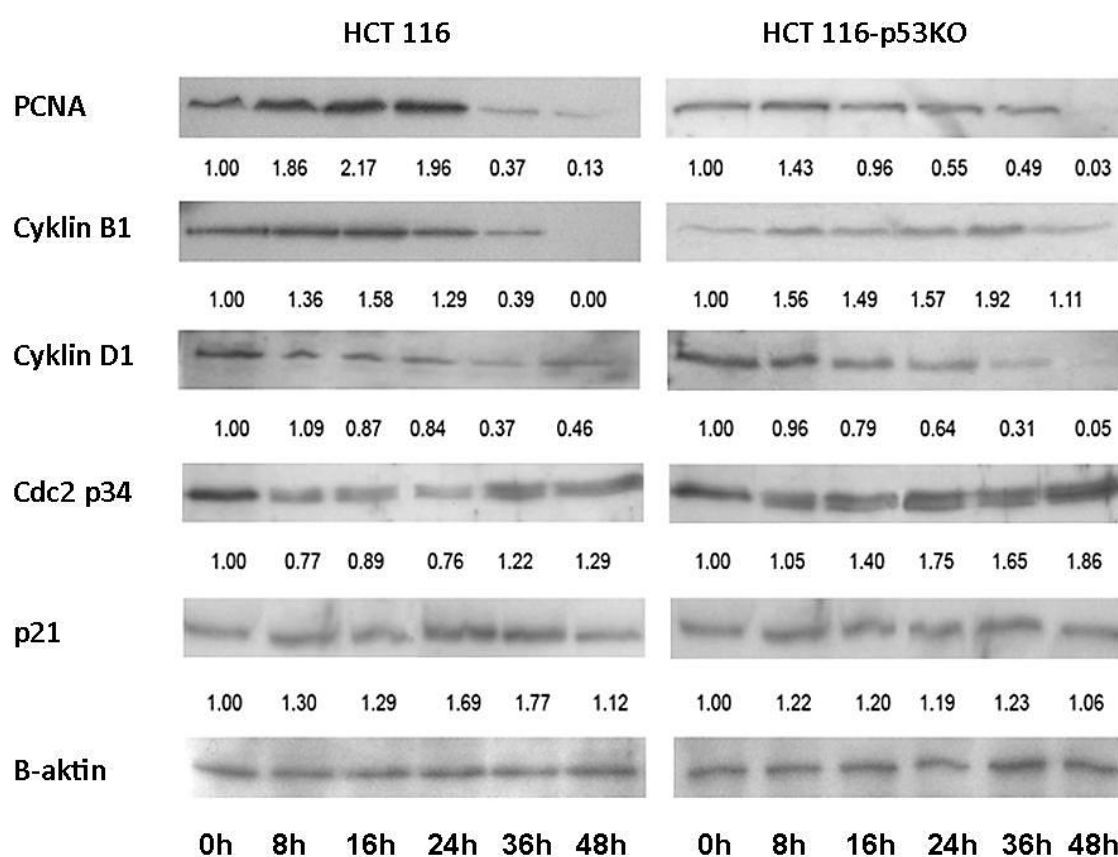
Obr. 5-4B Distribuce fází buněčného cyklu buněk HCT 116 a HCT 116-p53KO po ovlivnění seleničitanem sodným v koncentracích 2,5 μM, 5 μM a 10 μM v intervalu 48 h, analyzovaná pomocí kombinovaného barvení fluorescenčně značenou protilátkou proti cyklinu A2 (svislé osy) a propidium jodidem (vodorovné osy).



Obr. 5-4C,D Procento buněk pozitivních na cyklin A2 u linií HCT 116 a HCT 116-p53KO po ovlivnění seleničitanem sodným v intervalu 24 h (C) a 48 h (D). * významný rozdíl proti kontrole (HCT 116), + významný rozdíl proti kontrole (HCT 116-p53KO), ** významný rozdíl mezi liniemi HCT 116 a HCT 116-p53KO, $p < 0.05$.

5.5. Změny v expresi proteinů spojených s buněčným cyklem

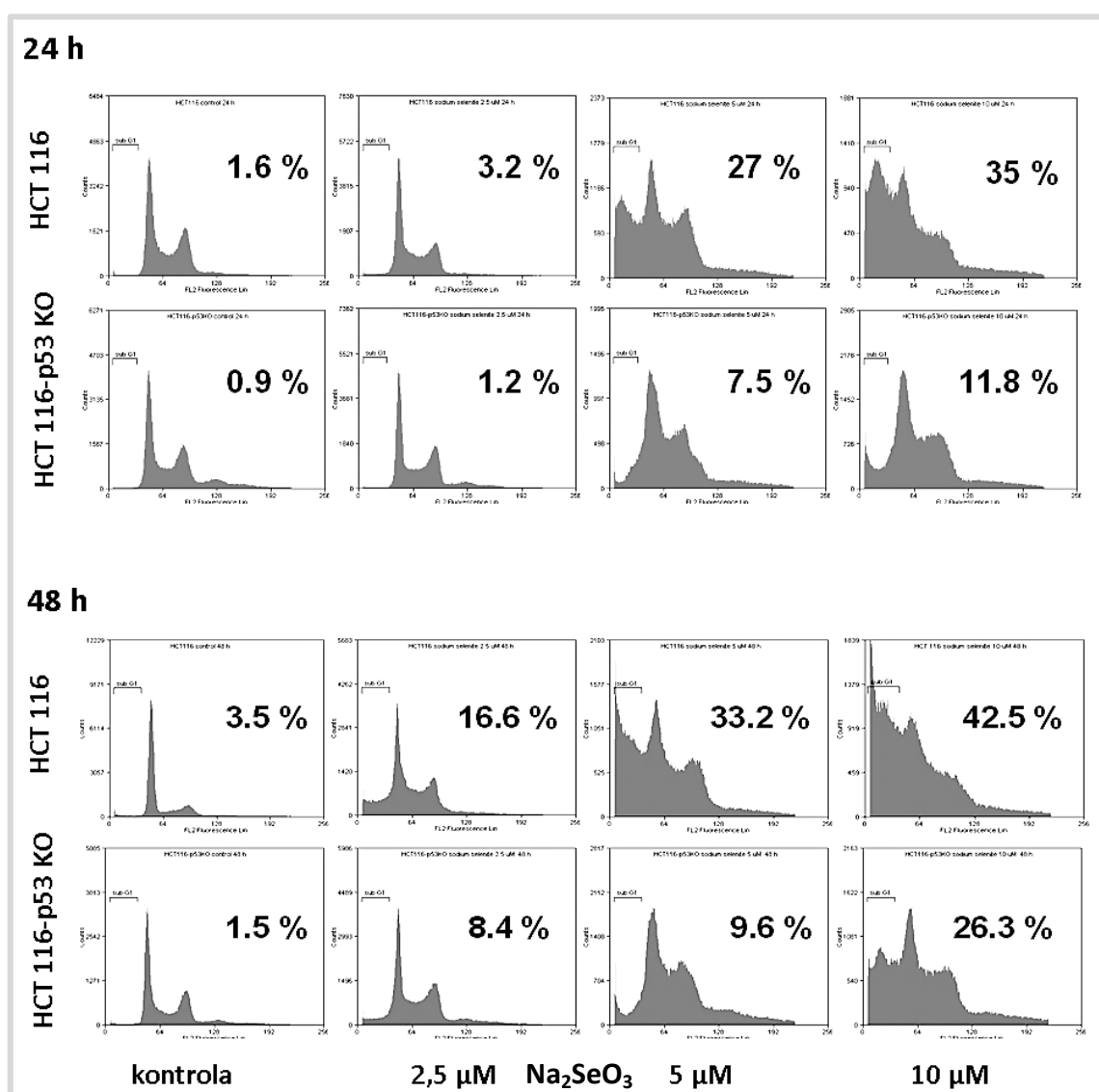
Vliv seleničitanu sodného v koncentraci 10 μ M na expresi proteinů spojených s buněčným cyklem byl stanoven pomocí Western blottingu. (Obr. 5-5). Po ovlivnění seleničitanem sodným došlo k přechodnému zvýšení a následnému poklesu exprese proteinu PCNA u obou sledovaných linií, u buněk HCT 116 byl přechodný vzestup exprese výraznější a delší. Exprese cyklinu B1 u linie HCT 116 stoupala během 16 h ovlivnění, poté začala klesat, zatímco u linie HCT 116-p53KO přetrvala zvýšená exprese cyklinu B1 nejméně do 36 h po ovlivnění. U obou linií došlo k poklesu exprese cyklinu D1. Exprese kinázy Cdc2 p34 (Cdk1) u linie HCT 116 po přechodném poklesu mírně stoupla, u buněk HCT 116-p53KO stoupala během 48 h ovlivnění. U obou linií byla indukována exprese proteinu p21 (Obr. 5-5).



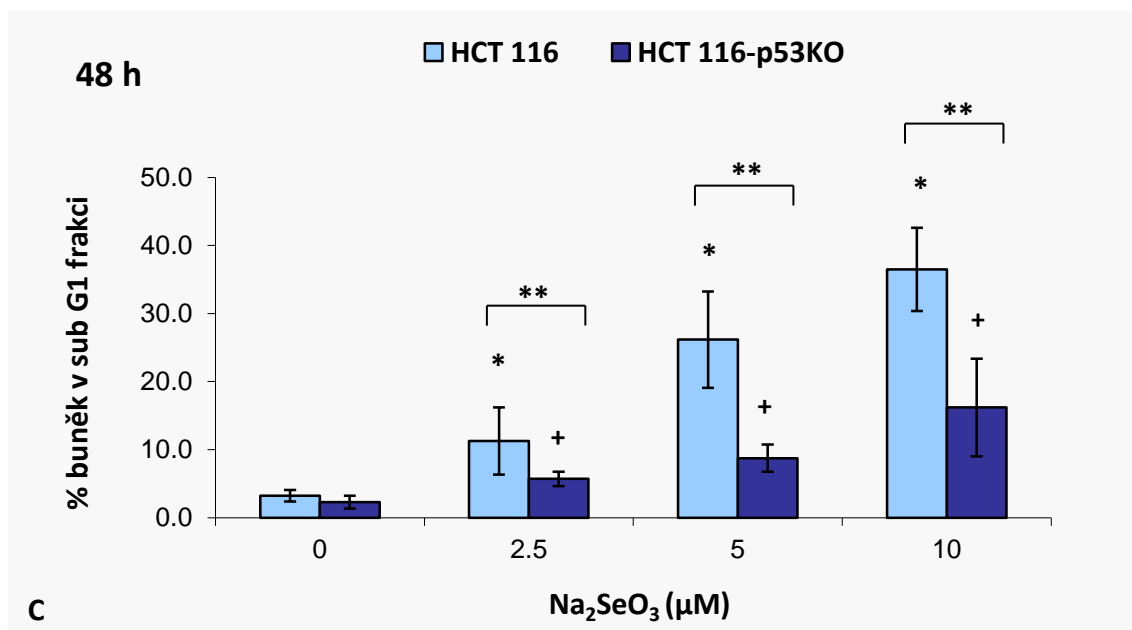
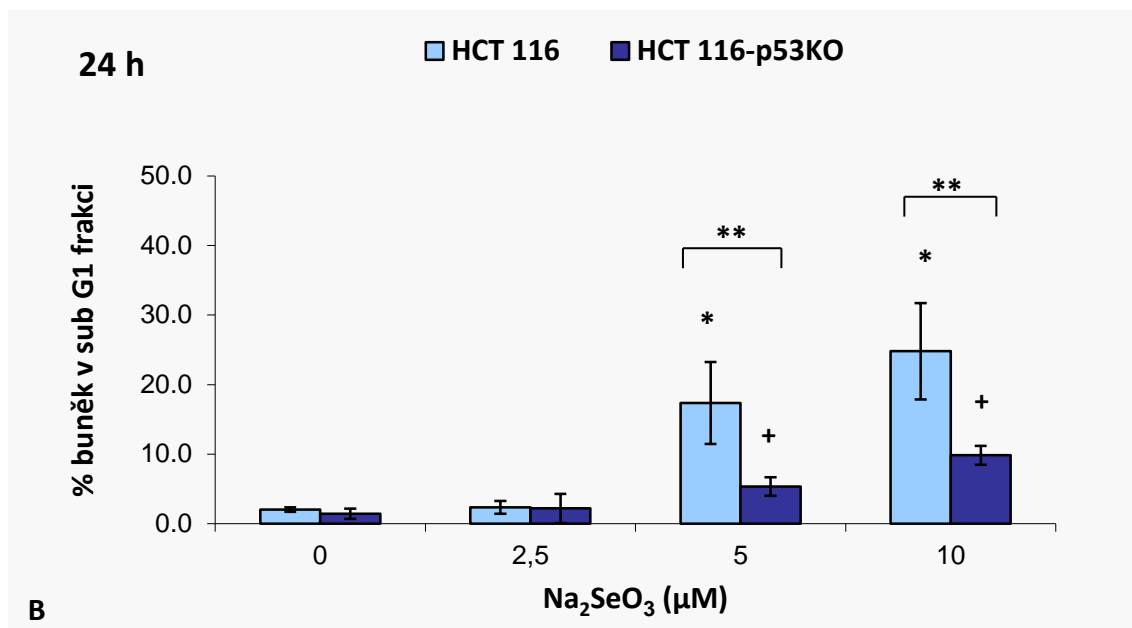
Obr. 5-5 Exprese proteinů spojených s buněčným cyklem u buněk linií HCT 116 a HCT 116-p53KO po ovlivnění seleničitanem sodným v průběhu 48 h.

5.6. Stanovení sub G1 frakce buněčného cyklu

Velikost sub G1 frakce buněčného cyklu u buněk linií HCT 116 a HCT 116-p53KO byla stanovena pomocí průtokové cytometrie metodou barvení DNA propidium jodidem. Seleničitan sodný v koncentracích 2,5 μM , 5 μM a 10 μM měnil distribuci fází buněčného cyklu a způsoboval zvýšení sub G1 frakce (Obr. 5-6A). Tento účinek byl významně silnější u buněk linie HCT 116 a to od koncentrace 5 μM seleničitanu sodného v časovém intervalu 24 h a od koncentrace 2,5 μM seleničitanu sodného v intervalu 48 h (Obr. 5-6B,C).



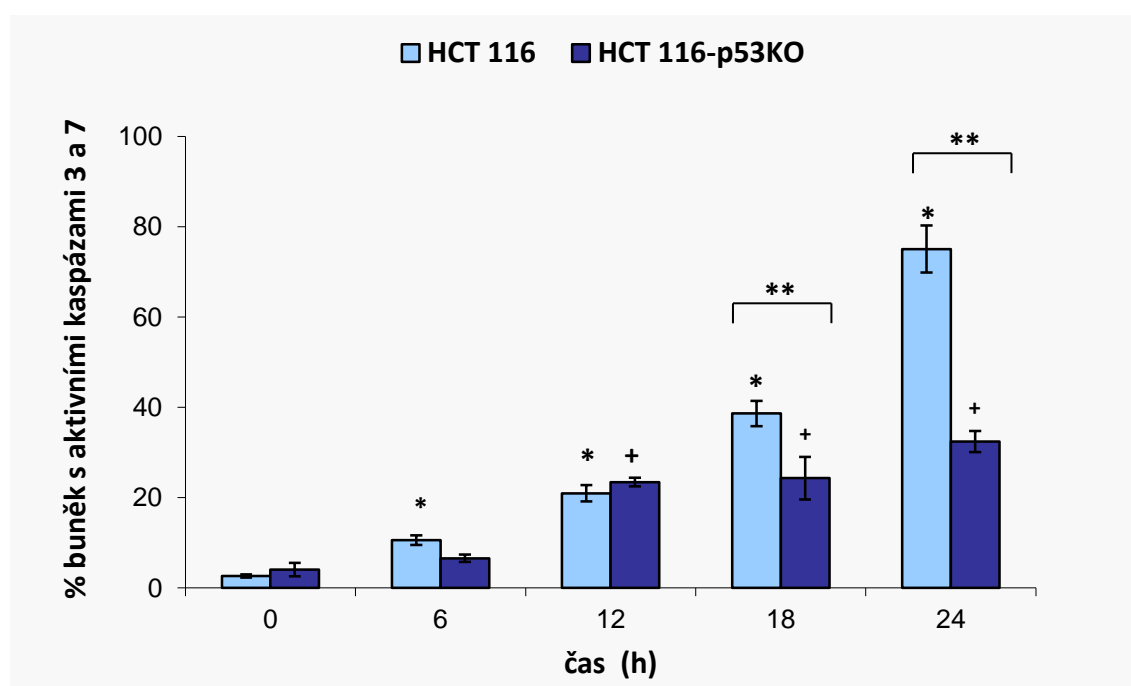
Obr. 5-6A Distribuce fází buněčného cyklu a velikost sub G1 frakce v % celkového počtu buněk u linií HCT 116 a HCT 116-p53KO po ovlivnění seleničitanem sodným v koncentracích 2,5 μM , 5 μM a 10 μM v intervalech 24 h a 48 h.



Obr. 5-6B,C Velikost sub G1 frakce v % celkového počtu buněk u linií HCT 116 a HCT 116-p53KO po ovlivnění seleničitanem sodným v koncentracích 2,5 μM, 5 μM a 10 μM v intervalech 24 h (B) a 48 h (C). * významný rozdíl proti kontrole (HCT 116), + významný rozdíl proti kontrole (HCT 116-p53KO), ** významný rozdíl mezi liniemi HCT 116 a HCT 116-p53KO, $p < 0.05$.

5.7. Aktivita kaspáz 3 a 7

Vliv seleničitanu sodného v koncentraci 10 μM na aktivitu kaspáz 3 a 7 u buněk linií HCT 116 a HCT 116-p53KO v průběhu 24 h byl stanoven pomocí průtokové cytometrie za použití fluorescenčního inhibitoru kaspáz (FLICA). Seleničitan sodný v koncentraci 10 μM zvyšoval procento buněk pozitivních na přítomnost aktivních kaspáz 3 a 7. Významný nárůst frakce pozitivních buněk ve srovnání s časem 0 h byl zaznamenán u linie HCT 116 od 6 h po ovlivnění, u linie HCT 116-p53KO od 12 h po ovlivnění. Statisticky významný rozdíl mezi liniemi byl patrný v intervalu 18 h a 24 h, kdy procento buněk s aktivními kaspázami 3 a 7 bylo vyšší u linie HCT 116 (Obr.5-7).



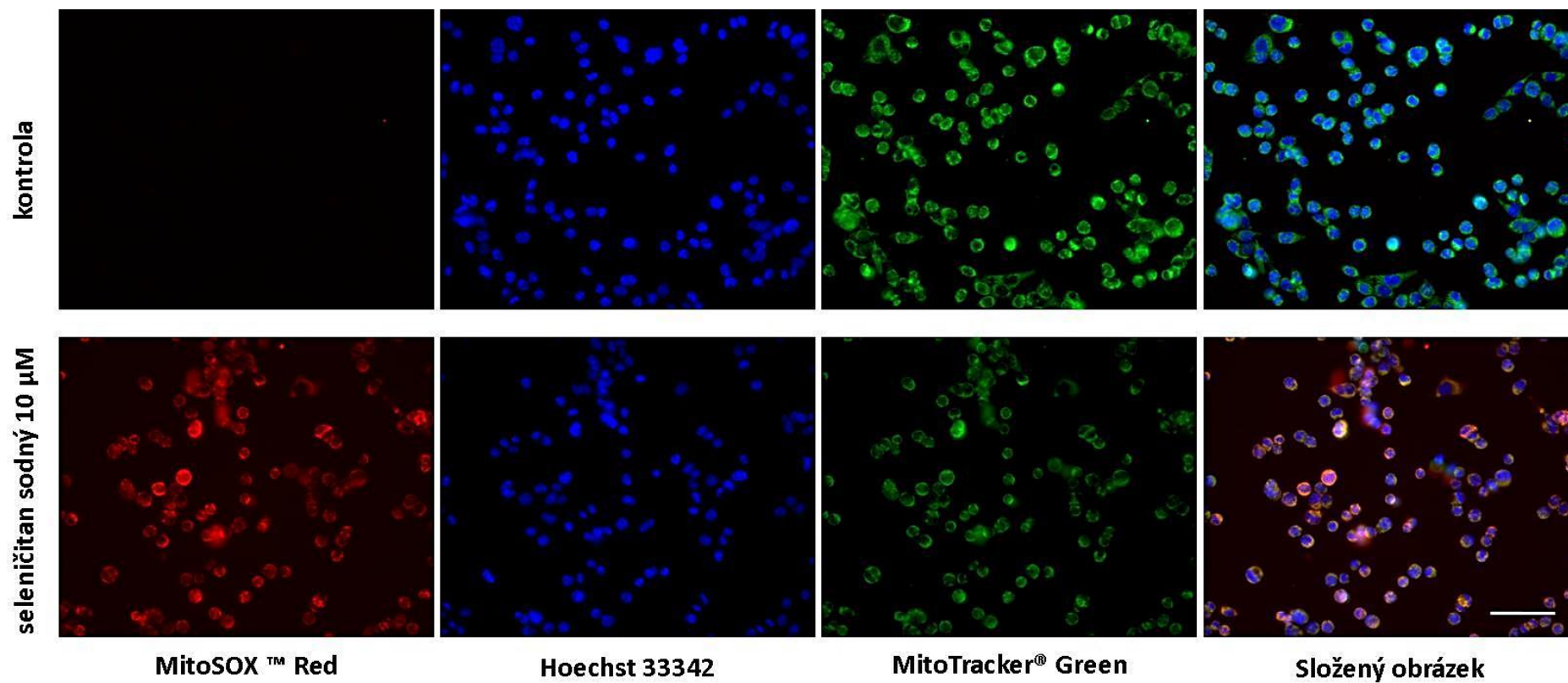
Obr. 5-7 Procento buněk linií HCT 116 a HCT 116-p53KO pozitivních na přítomnost aktivovaných kaspáz 3 a 7, ovlivněných seleničitanem sodným v koncentraci 10 μM během 24 h. * významný rozdíl proti kontrole (HCT 116), + významný rozdíl proti kontrole (HCT 116-p53KO), ** významný rozdíl mezi liniemi HCT 116 a HCT 116-p53KO, $p < 0.05$.

5.8. Produkce superoxidu v mitochondriích

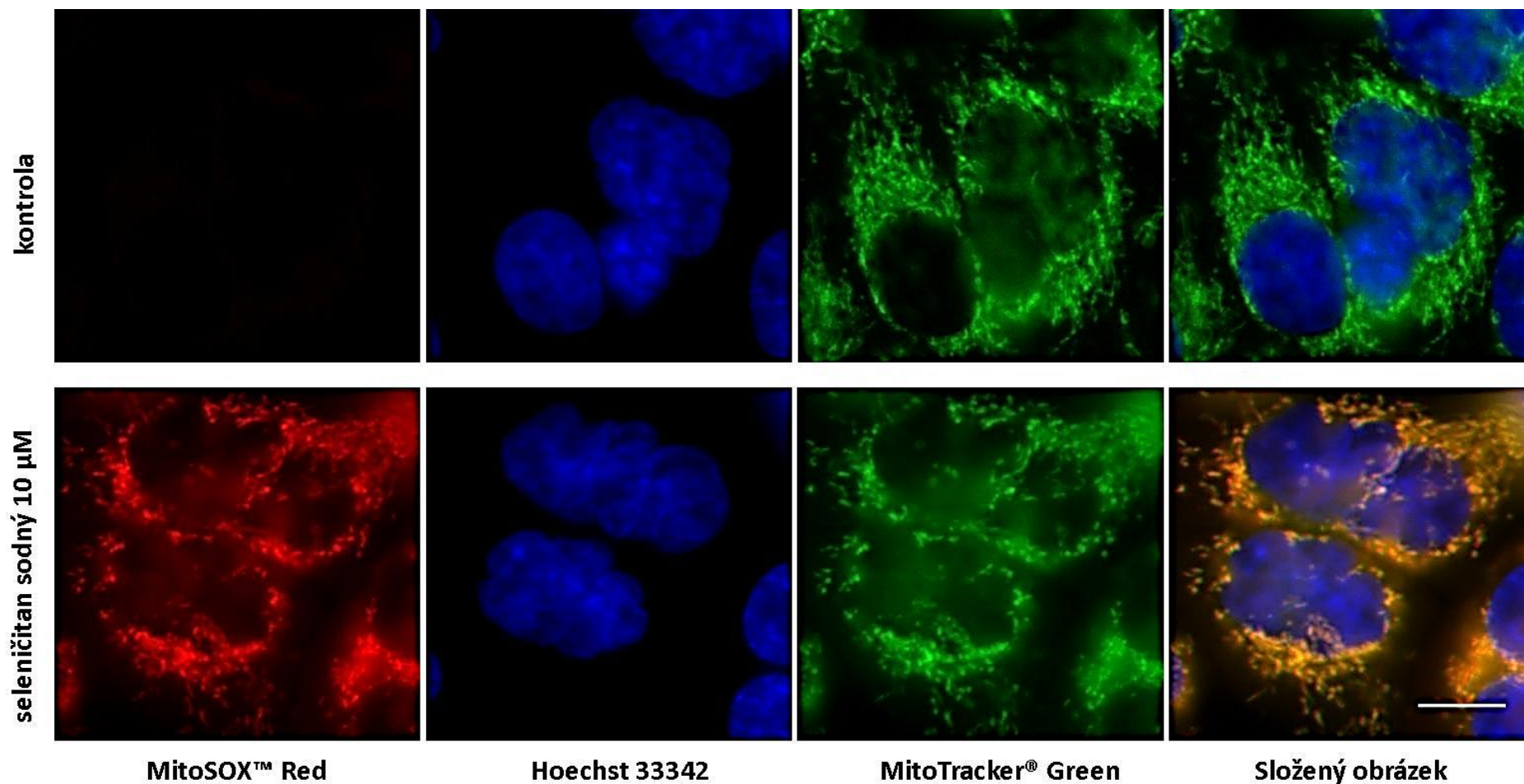
Produkce superoxidu v mitochondriích buněk HCT 116 byla detekována kombinovaným fluorescenčním barvením MitoTracker®Green pro detekci mitochondrií a MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator pro detekci superoxidu. Seleničitan sodný v koncentraci 10 μ M v časových intervalech 3 h, 6 h, 12 h, 18 h a 24 h stimuloval produkci superoxidu v mitochondriích, což se projevilo intenzivní červenou fluorescencí mitochondrií. Obr. 5-8 ukazuje kontrolní a ovlivněné buňky v intervalu 3 h po ovlivnění; (A) celkový pohled, (B) detail.

5.9. Vliv prooxidantu (BSO) a antioxidantu (MnTMPyP) na proliferaci buněk ovlivněných seleničitanem sodným

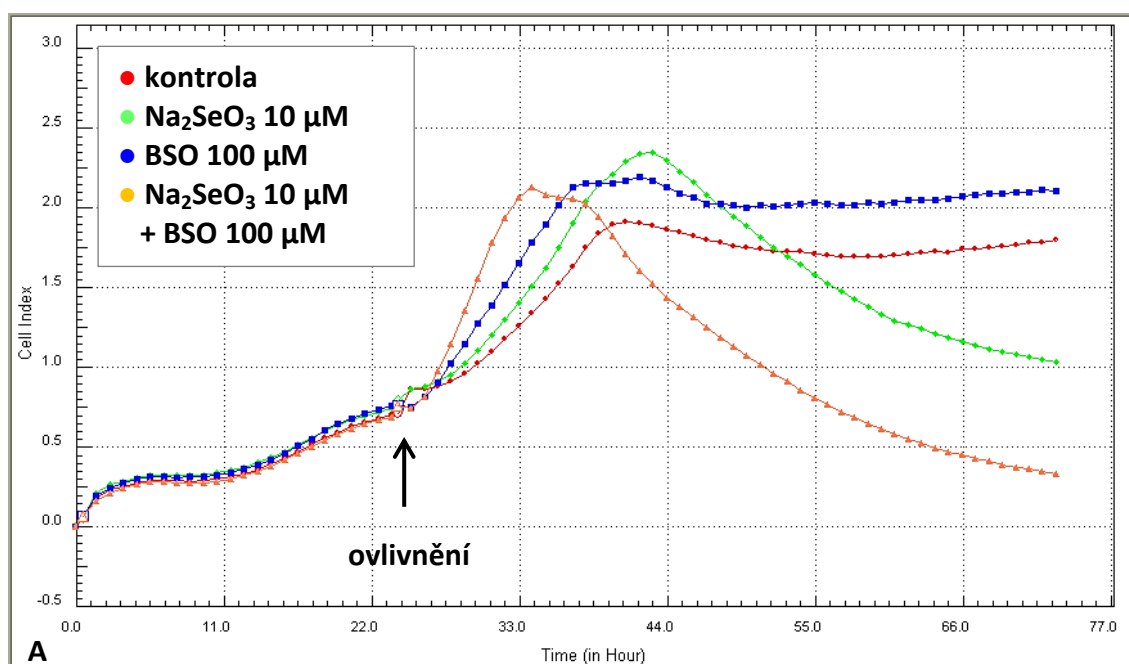
Vliv seleničitanu sodného v kombinaci s BSO (L-buthionin-sulfoximin) a MnTMPyP (Mn(III)tetrakis(1-Methyl-4-pyridyl)porphyrin pentachloride) na proliferaci buněk HCT 116 byl sledován v průběhu 48 h metodou měření impedance pomocí systému xCELLigence. Kombinace 100 μ M BSO + 10 μ M seleničitanu sodného způsobila nejprve nárůst a poté výrazný pokles buněčného indexu ve srovnání se samotným 10 μ M seleničitanem sodným (Obr. 5-9A), hodnoty buněčného indexu po 48 h ovlivnění jsou vyneseny v grafu na Obr.5-9B. Naopak MnTMPyP v koncentraci 5 μ M téměř eliminoval cytotoxický účinek seleničitanu sodného (Obr. 5-9C), hodnoty buněčného indexu dosažené po 48 h ovlivnění jsou uvedeny na Obr.5-9D.



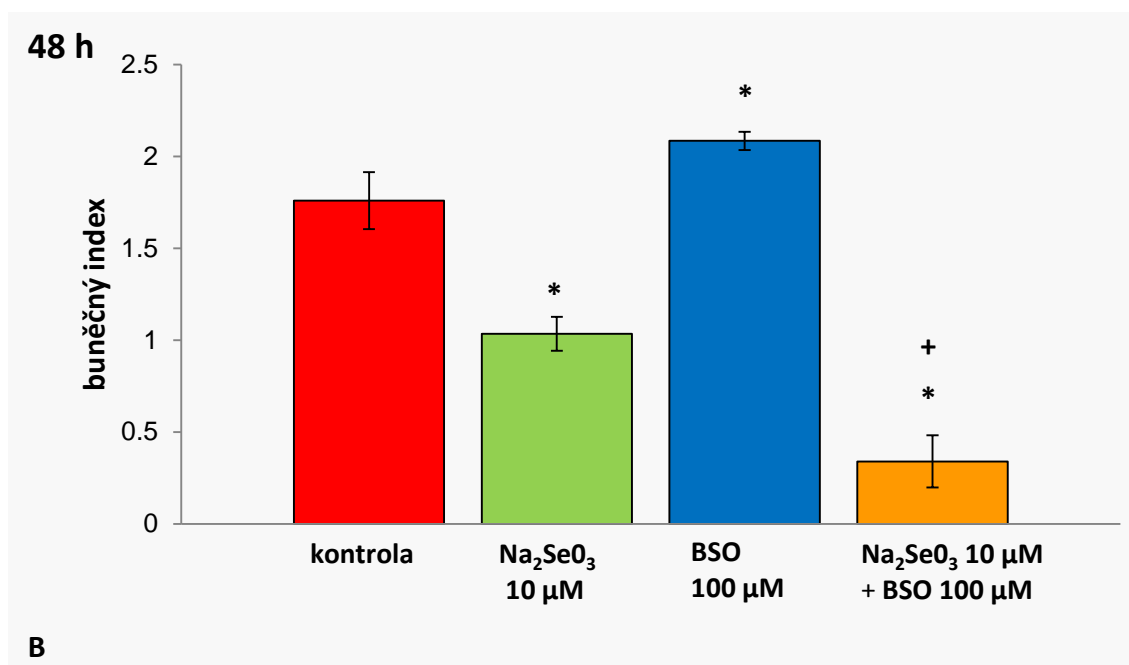
Obr. 5-8A Fluorescenční detekce superoxidu v buňkách linie HCT 116. Nahoře - kontrolní buňky, dole - buňky ovlivněné seleničitanem sodným v koncentraci 10 μ M v časovém intervalu 3 h. Červená fluorescence – superoxid, modrá fluorescence – jádra, zelená fluorescence – mitochondrie. Měřítko 100 μ m.



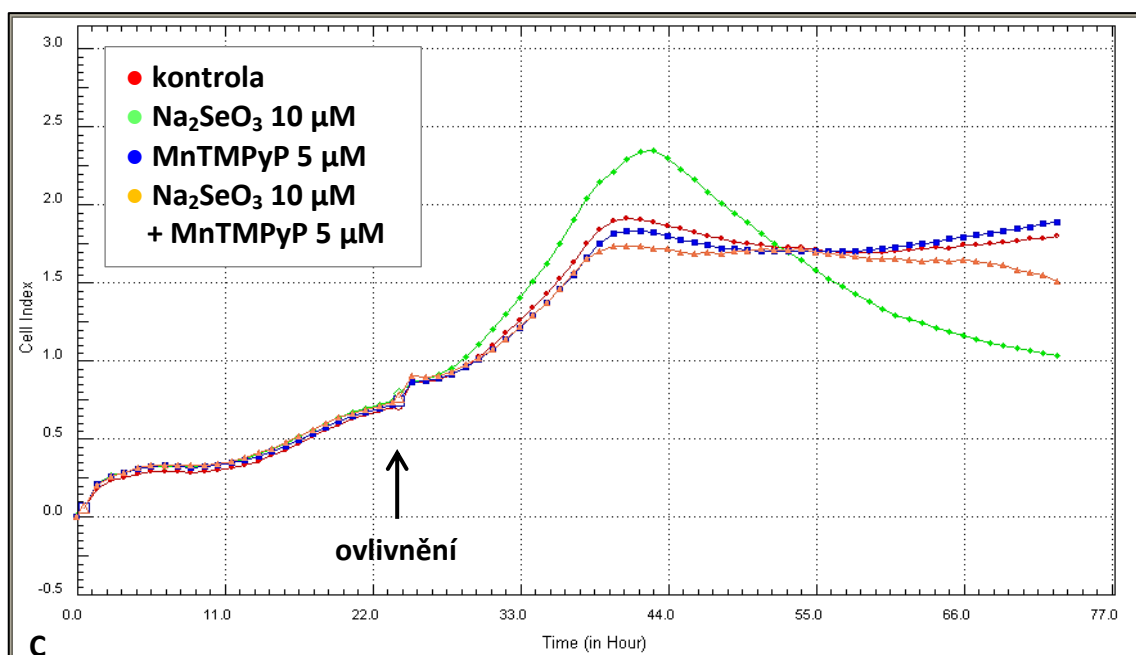
Obr. 5-8B Fluorescenční detekce superoxidu v buňkách linie HCT 116. Nahoře - kontrolní buňky, dole - buňky ovlivněné seleničitanem sodným v koncentraci 10 μ M v časovém intervalu 3 h. Červená fluorescence – superoxid, modrá fluorescence – jádra, zelená fluorescence – mitochondrie. Měřítko 10 μ m.



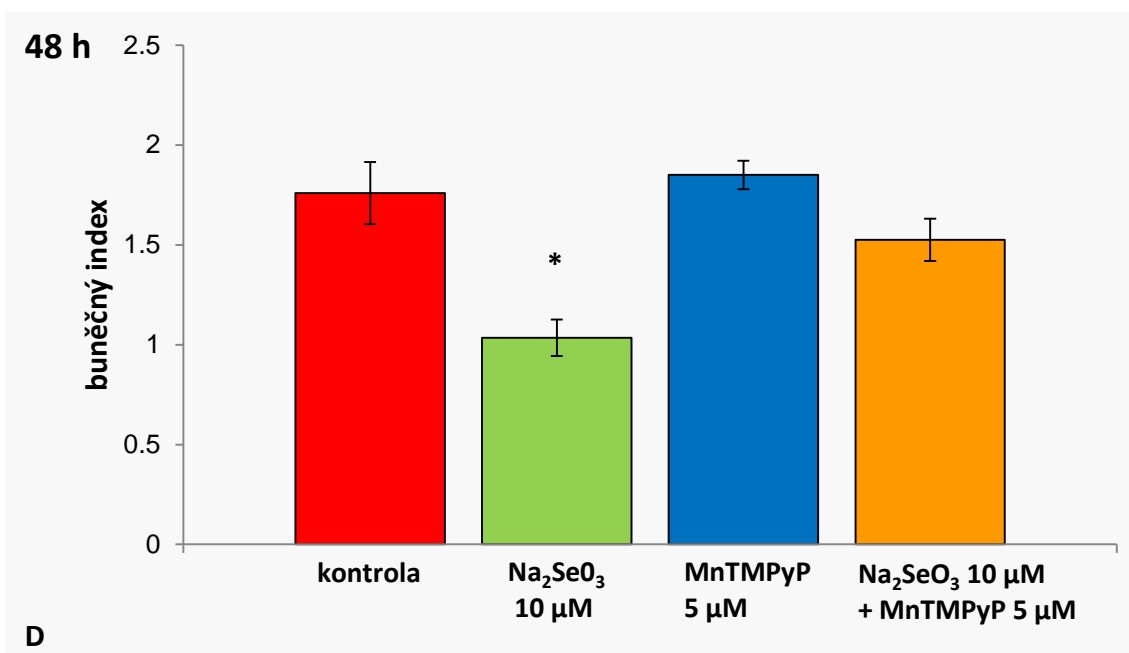
Obr. 5-9A Průběžné měření vlivu BSO a MnTMPyP na proliferaci buněk linie HCT 116 ovlivněných seleničitanem sodným. Buněčný index v průběhu 24 h prekulivace a 48 h ovlivnění 10 µM seleničitanu sodného a 100 µM BSO samostatně a v kombinacích.



Obr. 5-9B Buněčný index buněk HCT 116 po 48 h ovlivnění 10 µM seleničitanu sodného a 100 µM BSO samostatně a v kombinaci. * významný rozdíl proti kontrole, + významný rozdíl proti Na₂SeO₃ 10 µM, $p < 0.05$.



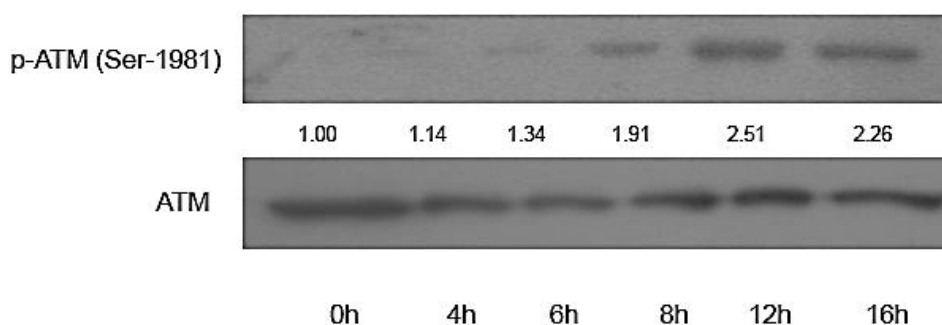
Obr. 5-9C Průběžné měření vlivu antioxidantu MnTMPyP na proliferaci buněk linie HCT 116 ovlivněných seleničitanem sodným. Buněčný index v průběhu 24 h prekultivace a 48 h ovlivnění 10 µM seleničitanu sodného a 5 µM MnTMPyP samostatně a v kombinaci.



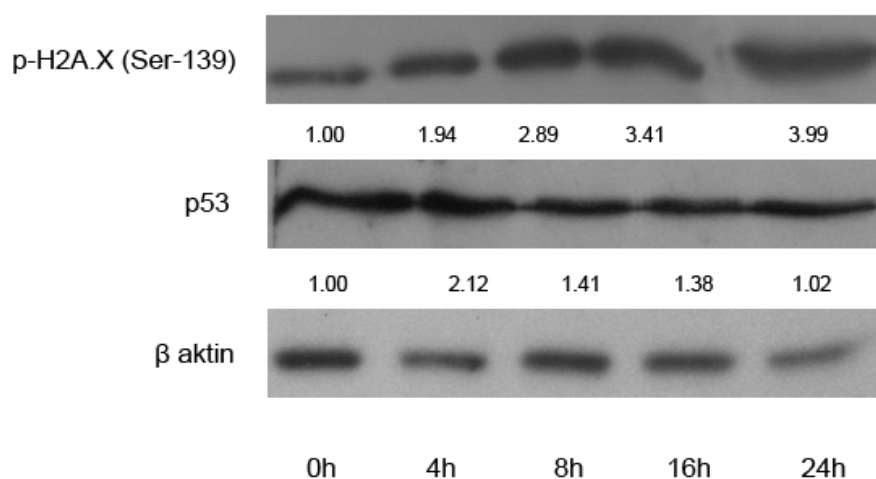
Obr. 5-9D Buněčný index buněk HCT 116 po 48 h ovlivnění 10 µM seleničitanu sodného a 5 µM MnTMPyP samostatně a v kombinaci. * významný rozdíl proti kontrole, $p < 0.05$.

5.10. Poškození DNA a exprese proteinu p53

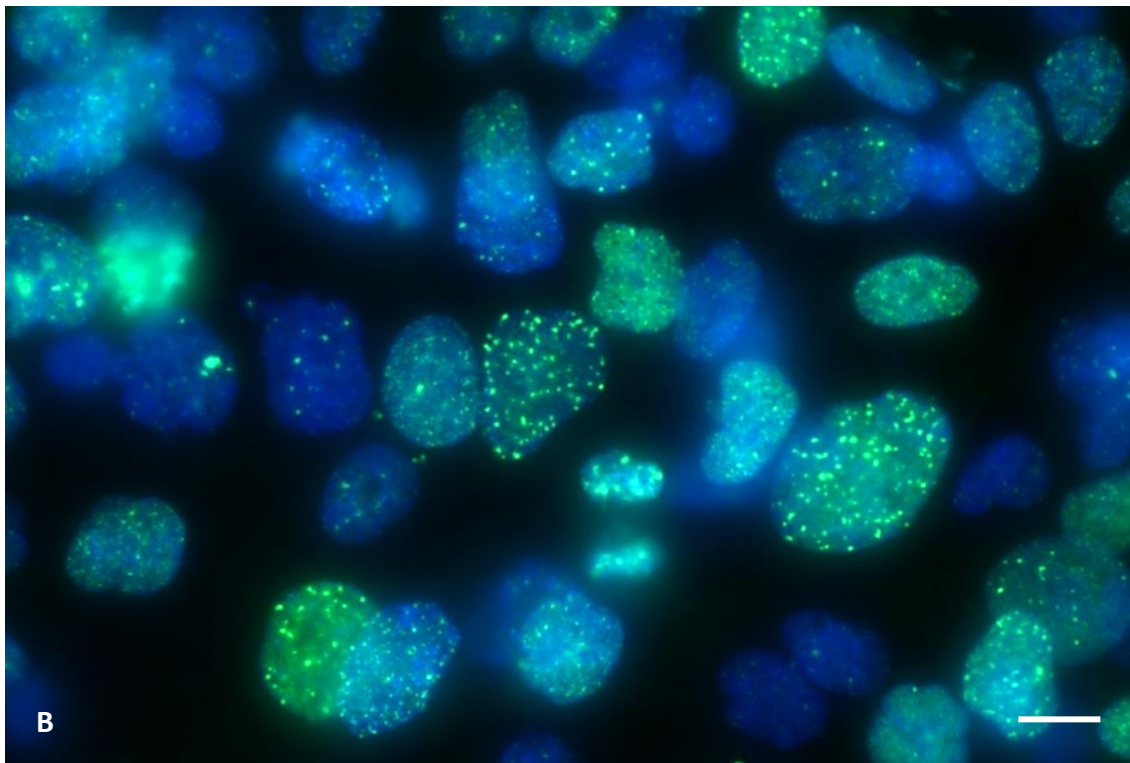
Expres proteinů indikujících poškození DNA u buněk HCT 116 po ovlivnění seleničitanem sodným v koncentraci 10 μ M byla detekována metodou Western blottingu a imunofluorescenčním barvením. Seleničitan sodný v uvedené koncentraci zvyšoval množství fosforylované ATM kinázy (Obr. 5-10A), fosforylovaného histonu H2A.X a proteinu p53 (Obr. 5-10B). Přítomnost fosforylovaného histonu H2A.X byla detekována rovněž pomocí imunofluorescenčního barvení (detail Obr. 5-10C, detekce v průběhu 24 h po ovlivnění Obr. 5-10D).



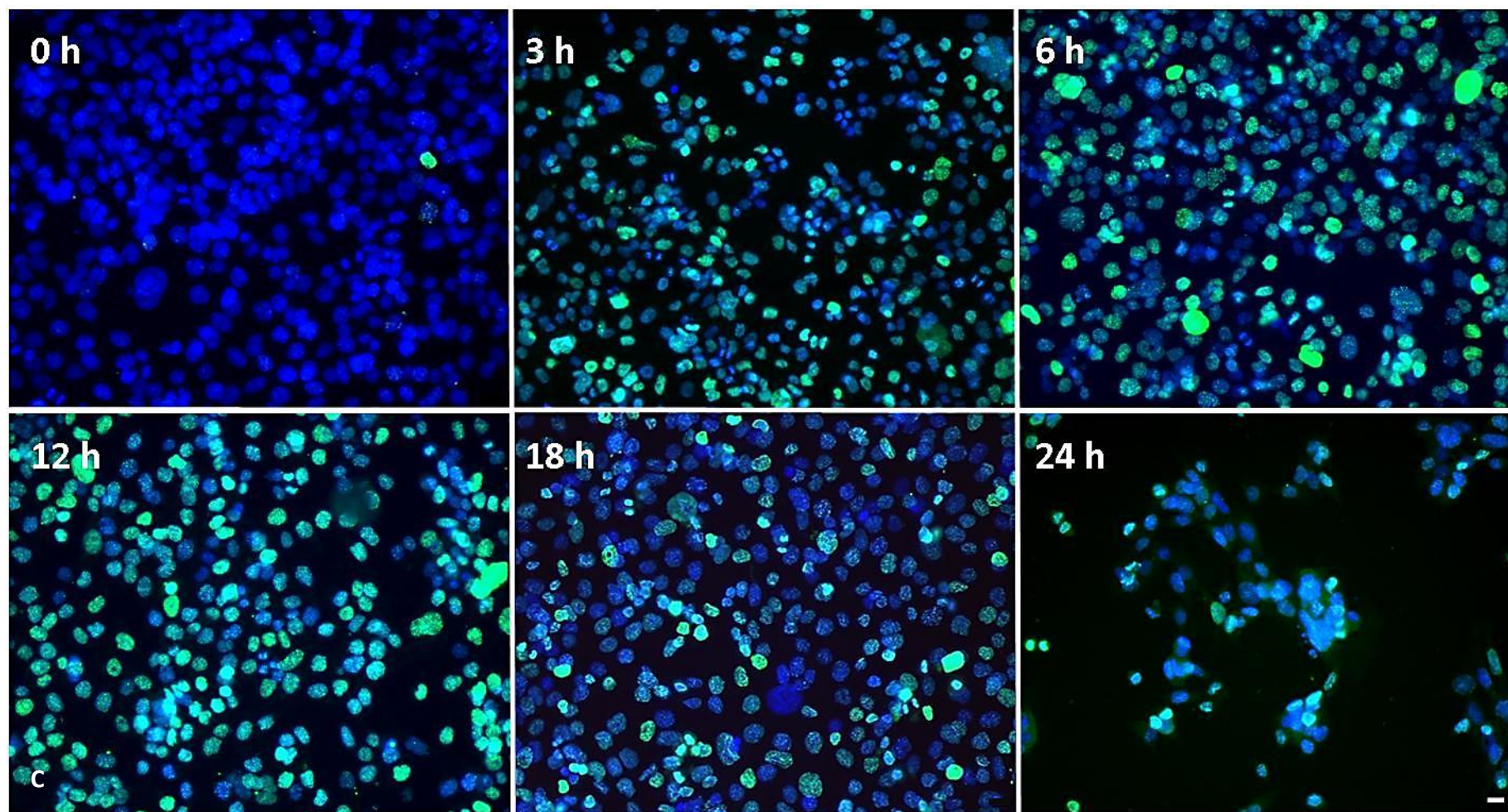
Obr. 5-10A Expres fosforylované kinázy ATM u buněk HCT 116 ovlivněných seleničitanem sodným v koncentraci 10 μ M.



Obr. 5-10B Expres fosforylovaného histonu H2A.X a proteinu p53 u buněk HCT 116 ovlivněných seleničitanem sodným v koncentraci 10 μ M.



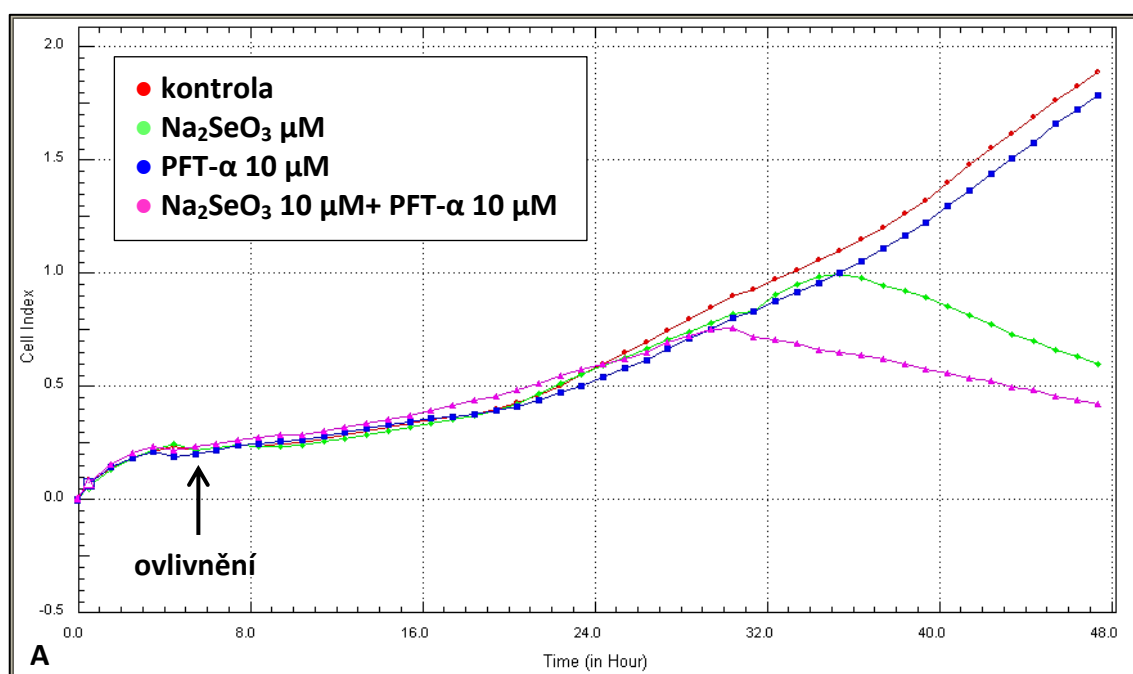
Obr. 5-10C Imunofluorescenční detekce fosforylovaného histonu H2A.X v buňkách linie HCT 116 po ovlivnění seleničitanem sodným v koncentraci 10 μ M v intervalu 6 h. Měřítko 10 μ m.



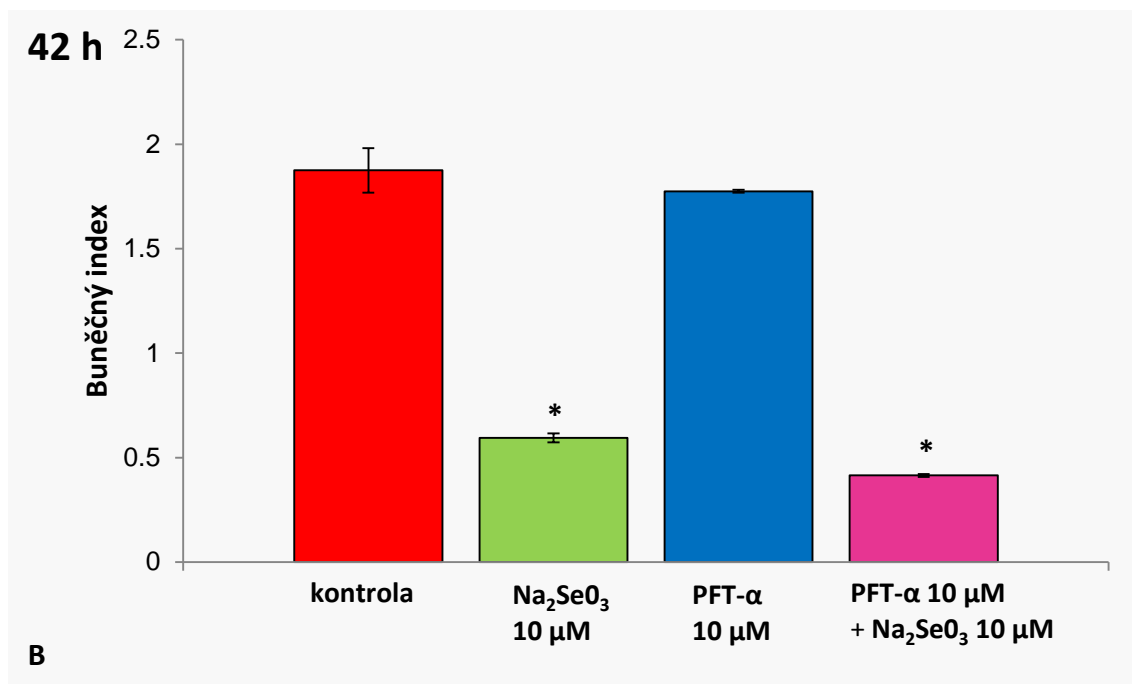
Obr. 5-10D Imunofluorescenční detekce fosforylovaného histonu H2A.X v buňkách linie HCT 116 v průběhu 24 h ovlivnění seleničitanem sodným v koncentraci 10 μ M. Měřítka - 10 μ m.

5. 11. Vliv pifithrinu- α na antiproliferační a proapoptotické účinky seleničitanu sodného

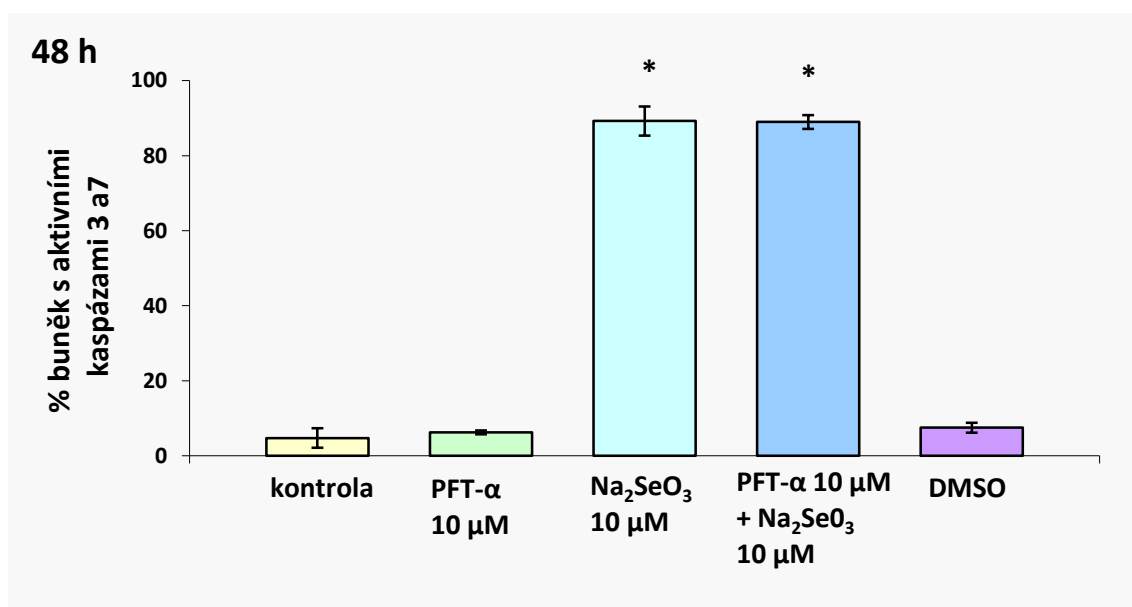
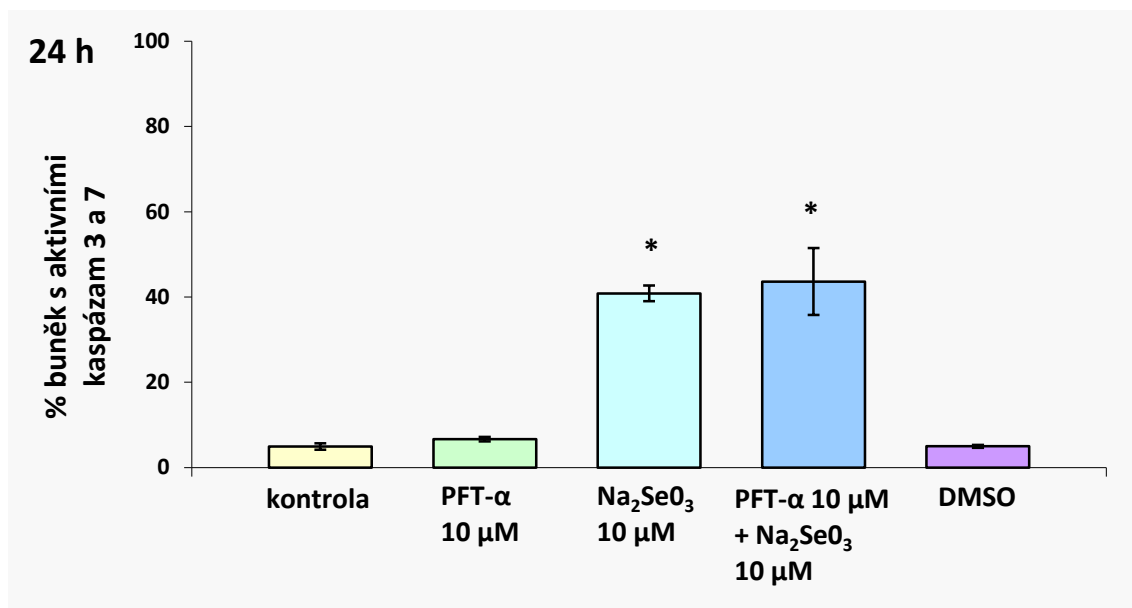
Vliv pifithrinu- α na proliferaci buněk linie HCT 116 po ovlivnění 10 μM seleničitanu sodného byl sledován v průběhu 48 h metodou měření impedance pomocí systému xCELLigence a dále měřením aktivity kaspáz 3 a 7 metodou FLICA pomocí průtokové cytometrie. Pifithrin- α v koncentraci 10 μM nezabránil snížení buněčného indexu u buněk ovlivněných seleničitanem sodným (obr. 5-11A,B), rovněž neměl vliv na aktivaci kaspáz 3 a 7 (obr. 5-11C,D).



Obr. 5-11A Průběžné monitorování vlivu pifithrinu- α (PFT- α) na proliferaci buněk linie HCT 116 ovlivněných seleničitanem sodným metodou měření impedance. Buněčný index v průběhu 6 h prekultivace a 42 h ovlivnění 10 μM seleničitanu sodného a 10 μM PFT- α samostatně a v kombinaci.



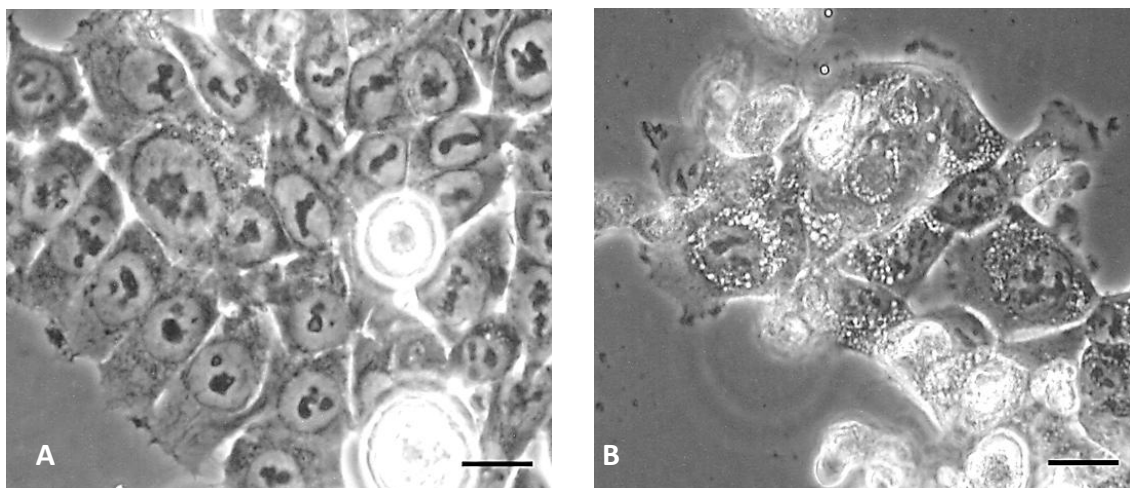
Obr. 11-B Buněčný index po 48 h ovlivnění buněk HCT 116 10 μM seleničitanu sodného a 10 μM pifithrinu-α (PFT-α) samostatně a v kombinaci. * významný rozdíl proti kontrole, $p < 0.05$.



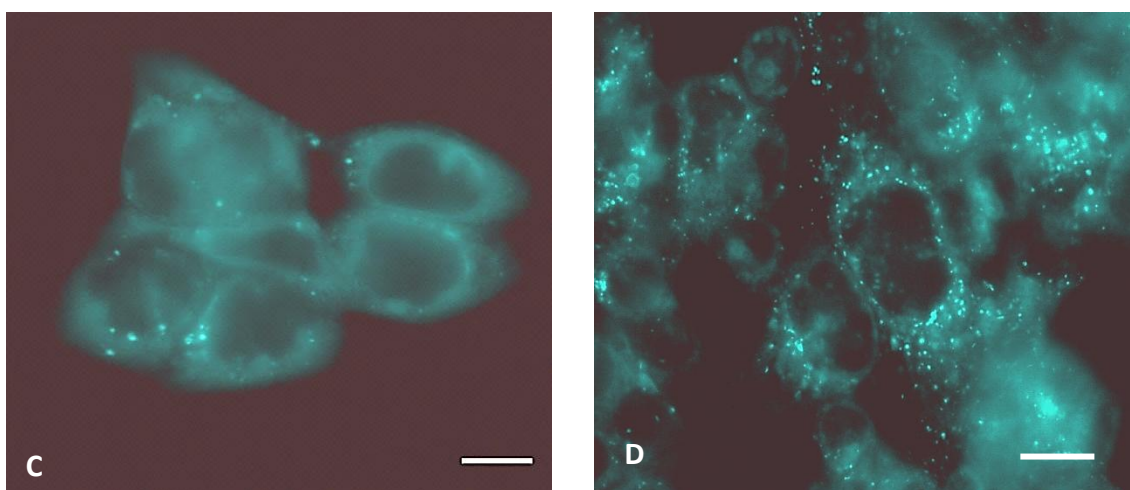
Obr. 5-11C,D Procento buněk HCT 116 s aktivovanými kaspázami 3 a 7 po ovlivnění 10 μM seleničitanu sodného a 10 μM pifithrinu-α (PFT-α) samostatně nebo v kombinaci v intervalu 24 h a 48 h. * statisticky významný rozdíl proti kontrole, $p < 0.05$.

5.12. Detekce autofagie

Markery autofagie u buněk HCT 116 po ovlivnění seleničitanem sodným v koncentraci 10 μM byly sledovány metodou imunofluorescenční detekce a Western blottingu. Seleničitan sodný způsoboval vakuolizaci cytoplazmy ovlivněných buněk a zvýšení intenzity barvení monodansylcadaverinem indikujícím přítomnost autofagických vakuol (Obr. 5-12A-D).

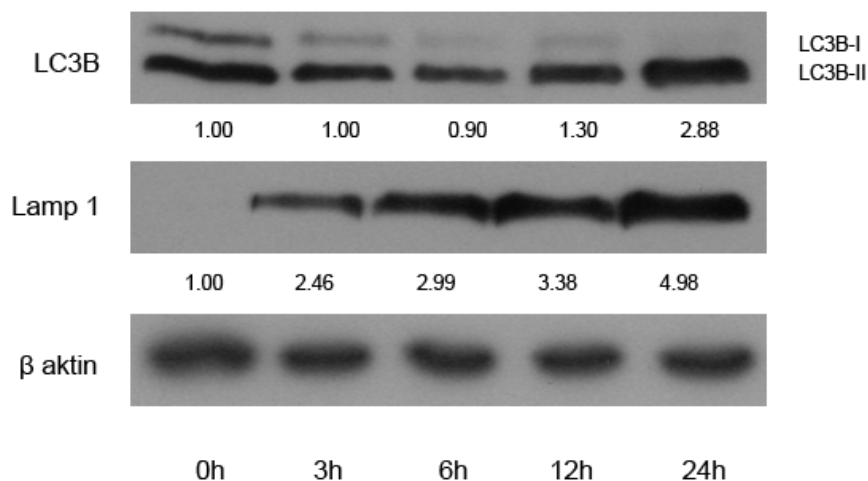


Obr. 5-12A,B Vakuolizace cytoplazmy u buněk HCT 116. (A) kontrola, (B) seleničitan sodný v koncentraci 10 μM v intervalu 24 h. Měřítka 10 μm .



Obr. 5-12A,B Fluorescence monodansylcadaverinu u buněk HCT 116. (A) kontrola, (B) seleničitan sodný v koncentraci 10 μM v intervalu 24 h. Měřítka 10 μm .

U ovlivněných buněk došlo také ke konverzi cytosolického LC3B-I proteinu na lipidovaný LC3B-II protein a k zvýšení exprese proteinu LAMP1 (Obr. 5-12E)



Obr. 5-12E Exprese proteinů LC3B a LAMP1 u buněk HCT 116 ovlivněných seleničitanem sodným v koncentraci 10 μM v intervalu 24 h.

6. DISKUSE

Sloučeniny selenu prokázaly v celé řadě klinických studií schopnost příznivě ovlivňovat výskyt nádorů u sledovaných jedinců a staly se jedněmi z nejintenzivněji studovaných chemopreventivních látek. Rovněž studie využívající laboratorních zvířat a buněčných modelů *in vitro* přinesly mnoho důkazů o jejich protinádorovém působení, zároveň však odhalily složitost pochodů, které se odehrávají v buňkách po ovlivnění selenem. Biologické účinky selenu jsou závislé na koncentraci a chemické formě sloučeniny a také, jak se stále více ukazuje, na typu buněčného modelu. Nádorové buňky jsou velmi heterogenní, maligního potenciálu dosahují různými mechanismy a obsahují aktivační či inhibiční mutace a epigenetické změny v různých signálních drahách, což může ovlivnit jejich reakci na působení selenu. Na druhou stranu sloučeniny selenu nepůsobí v buňce na jeden izolovaný děj nebo kompartment, jejich účinek je spíše komplexní a proto výsledek studie závisí na konkrétní kombinaci chemické formy selenu a studovaného buněčného modelu.

Seleničitan sodný byl jednou z prvních forem selenu používaných s úspěchem v chemoprevenci, později byla však zdůrazňována jeho vyšší toxicita a proto byl v klinických studiích opomíjen [130]. Negativní výsledek projektu SELECT, rozsáhlé klinické studie zaměřené na chemoprevenci nádorů prostaty selenem a vitaminem E, přinesl značné rozčarování a zároveň dal podnět k diskusi o možných příčinách neúspěchu. Jedním z nejvíce diskutovaných faktorů je volba selenomethioninu, organické sloučeniny selenu podávané v této studii samostatně nebo v kombinaci s vitaminem E. V této souvislosti došlo k znovuobjevení seleničitanu jako vhodné formy selenu pro použití v klinických studiích [131] a to tím spíše, že i pokusy *in vitro* přinesly další řadu důkazů o jeho protinádorovém působení [132].

Seleničitan sodný prokázal schopnost inhibovat proliferaci a indukovat buněčnou smrt u různých typů nádorových buněčných linií, zejména u buněk nádorů prostaty [110], děložního čípku [112], plic [133] a leukémií [134]. Relativně málo prací se však zabývalo účinky seleničitanu sodného v modelu kolorektálního karcinomu, přestože právě tento typ nádoru v klinických studiích příznivě reagoval na suplementaci selenem [77]. Studie na buněčných liniích HT-29 a SW-480 ukázaly, že seleničitan sodný inhibuje růst buněk těchto linií a aktivuje mitochondriální cestu apoptózy v důsledku produkce

ROS za účasti vápenatých iontů [135, 136]. V této souvislosti však nebyly k dispozici informace o roli proteinu p53 v reakci buněk kolorektálního karcinomu na buněčný stres způsobený seleničitanem sodným. Je známo, že protein p53 hraje klíčovou roli v odpovědi buněk na poškození DNA a v aktivaci apoptózy a že je v buňkách kolorektálního karcinomu velmi často inaktivován v důsledku mutací, a to zejména v pozdních stádiích onemocnění [21]. Proto jsme v rámci této práce provedli sérii experimentů využívajících izogenní buněčné linie HCT 116 a HCT 116-p53KO lišící se pouze přítomností genu pro p53 protein, s cílem zjistit, jaká je citlivost těchto linií na seleničitan sodný a zda rozdíl v genotypu bude hrát roli v jejich odpovědi na ovlivnění touto látkou. Linie HCT 116 byla izolována z lidského kolorektálního karcinomu typu MSI [137], linie HCT 116-p53KO byla odvozena z původní buněčné linie metodou genového knock-outu [138]. Linie HCT 116 má funkční kontrolní body detekující poškození DNA a poruchy mitotického vřeténka [139] a proto je vhodným a používaným modelem pro studium dějů souvisejících s proliferací, regulací buněčného cyklu a apoptózou [140-144].

Z našich výsledků vyplývá, že seleničitan sodný inhibuje proliferaci a indukuje buněčnou smrt u obou modelových linií, a to v závislosti na koncentraci a době působení. Koncentrační rozmezí, v němž selen projevoval inhibiční účinky na proliferaci buněk bylo poměrně úzké. Zatímco koncentrace 2,5 μM u sledovaných linií vykazovala relativně mírný toxický účinek, koncentrace 10 μM již výrazně inhibovala proliferaci a indukovala buněčnou smrt. Pokud uvažujeme klinickou relevanci těchto dávek, koncentrace 2,5 μM seleničitanu sodného představuje 200 μg selenu/l, je tedy mírně vyšší než obvykle udávané koncentrace selenu v krvi zdravých jedinců, které se nejčastěji pohybují v rozmezí 76-151 $\mu\text{g/l}$ [131]. Zpráva WHO nicméně udává jako horní hranici zjištěnou u zdravých jedinců právě koncentraci 2,5 μM [65], zatímco koncentrace selenu v séru účastníků klinické studie SELECT dosahovaly při dlouhodobé suplementaci selenem hodnot až 250 $\mu\text{g/l}$ [82]. Koncentrace 5 μM odpovídá přibližně maximální bezpečné denní dávce, jak byla předběžně stanovena WHO, je však třeba mít na paměti, že tato hodnota bude s největší pravděpodobností upravena, až budou k dispozici spolehlivější údaje o metabolismu a distribuci selenu v lidském organismu [64]. Koncentrace 10 μM se již blíží hranici, kdy se u citlivých jedinců projevují příznaky selenózy [65].

Použité testy provedené v 96-jamkových destičkách (WST-1, stanovení celkového proteinu a intenzita syntézy DNA) sledují různé aspekty buněčného růstu, proliferace a metabolismu a proto se lišily poněkud ve své citlivosti. Relativně nejméně citlivou metodou se ukázalo měření metabolické aktivity redukcí WST-1, kdy u buněk HCT 116 došlo k významnému snížení měřených hodnot až od koncentrace 10 μ M seleničitanu sodného, u buněk HCT 116-p53KO až od 25 μ M této látky. Podobné zkušenosti jsme později zaznamenali i v případě dalších buněčných linií, kdy metoda WST-1 prokázala významně nižší schopnost detekovat toxické působení seleničitanu sodného v porovnání např. s testem MTT [145]. Naopak syntéza DNA stanovená metodou inkorporace BrDU vykazovala významné změny již při ovlivnění koncentrací 2,5 μ M seleničitanu sodného.

Přes popsané rozdíly v citlivosti jednotlivých metod bylo zřejmé, že buňky linie HCT 116-p53KO jsou odolnější vůči působení seleničitanu sodného než buňky původní linie HCT 116. Zvláště celkový obsah proteinu zůstal u buněk HCT 116-p53KO i při nejvyšších testovaných koncentracích seleničitanu sodného relativně vysoký, rozdíly v inkorporaci BrDU mezi liniemi naopak vymizely již při koncentraci 10 μ M, což svědčí o tom, že u buněk linie HCT 116-p53KO seleničitan sodný v této koncentraci sice výrazně inhiboval proliferaci buněk, ty však nereagovaly na inhibici proliferace buněčnou smrtí v takovém rozsahu, jako buňky linie HCT 116. Tento závěr potvrzují i výsledky časosběrné mikroskopie a dalších provedených pokusů.

Antiproliferativní aktivita různých sloučenin selenu byla podle publikovaných údajů spojena se změnami v průběhu buněčného cyklu, proto jsme se rozhodli provést podrobnější analýzu distribuce fází buněčného cyklu metodou kombinovaného barvení fluorescenčně značenou protilátkou proti cyklinu A2 a 7-AAD, který značí DNA. Expres cyklinu A2 stoupá během S fáze a nejvyšších hodnot dosahuje v G2 fázi, v M fázi již není detekována [146]. Seleničitan sodný měnil distribuci fází buněčného cyklu v závislosti na koncentraci a buněčném typu. Buňky linie HCT 116-p53KO měly větší tendenci hromadit se v S/G2 fázích buněčného cyklu, což bylo zřejmé zejména v koncentracích 5 μ M a 10 μ M v intervalu 24 h a 10 μ M v intervalu 48 h. Ojedinělý mírný vzestup koncentrace cyklinu A2 u buněk HCT 116 v intervalu 48 h a koncentraci 5 μ M byl pozorován opakovaně. V dostupné literatuře jsme nenalezli údaje o expresi cyklinu A2 v souvislosti se seleničitanem sodným, domníváme se však, se jedná o přežívající

populaci buněk v situaci, kdy ostatní buňky již podléhaly buněčné smrti. Zástava buněčného cyklu v *S/G2* (případně *S/G2-M*) fázích po ovlivnění seleničitanem sodným byla pozorována u lidských buněk prostaty [110], u leukemických buněk linie HL-60 [106] a u myších buněk karcinomu prsu [147] a je považována za specifickou pro tuto formu selenu, zatímco methylované sloučeniny selenu zastavují buněčný cyklus spíše v *G1* fázi [148].

V buňkách obou linií ovlivněných seleničitanem sodným v koncentraci 10 μM jsme metodou Western blottingu analyzovali expresi proteinů spojených s regulací buněčného cyklu. U obou studovaných linií došlo k poklesu exprese cyklinu D1 v průběhu 48 h kultivace s 10 μM seleničitanu sodného. Exprese proteinu PCNA klesla u obou linií po přechodném vzestupu, který byl výraznější a déle trvající u linie HCT 116. Protein PCNA, všeobecně užívaný jako marker proliferace, váže mnohé proteiny účastníce se replikace, ale také opravy DNA [149], je tedy možné, že zvýšení jeho exprese je důsledkem reakce buněk na oxidativní poškození DNA seleničitanem. Exprese cyklinu B1 a kinázy Cdc2 byla zvýšena u obou buněčných linií, trvaleji však u linie HCT 116-p53KO. Časnější pokles exprese cyklinu B1 u buněk HCT 116 je v souladu se zjištěním, že exprese cyklinu B1 je přímo inhibována p53 [150]. Exprese proteinu p21 byla indukována po působení seleničitanu sodného u obou modelových linií, avšak výrazněji u linie HCT 116. Gen pro protein p21 obsahuje p53-responsivní element a exprese proteinu p21 je indukována proteinem p53 v odpovědi na poškození DNA [151]. Mírný nárůst exprese proteinu p21 u linie HCT 116-p53KO po ovlivnění seleničitanem sodným svědčí o indukci exprese tohoto proteinu nezávisle na proteinu p53, podobně jako v případě ovlivnění této linie adriamycinem a γ -zářením [144] a také kurkuminem [152].

Pro odhad rozsahu buněčné smrti jsme provedli stanovení sub *G1* frakce buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. Seleničitan sodný zvyšoval podíl buněk v sub *G1* frakci buněčného cyklu v závislosti na koncentraci a době působení. Také tato metoda potvrdila významně větší citlivost buněk HCT 116 vůči působení seleničitanu sodného a to zejména v koncentracích 5 μM a 10 μM . Jak je patrné z prezentovaných histogramů, v sub *G1* frakci nebyl detekován zřetelně ohraničený vrchol odpovídající populaci apoptotických buněk, spíše se jedná o různorodou frakci s širokým rozptylem hodnot a nelze tedy pouze na základě těchto výsledků posoudit typ buněčné smrti.

Z histogramů je rovněž zřejmá změna distribuce ostatních fází buněčného cyklu, zejména již zmíněné navýšení S/G2-M fází. Dosud publikované údaje o typu buněčné smrti indukované seleničitanem sodným se liší v závislosti na buněčném modelu a použitých detekčních metodách. Někteří autoři uvádějí pouze navýšení sub G1 frakce buněčného cyklu [123, 153, 154], kombinované případně s výsledky morfologické analýzy buněk svědčícími o přítomnosti apoptózy [136]. V buněčném modelu karcinomu prostaty linie LNCaP indukoval seleničitan sodný apoptózu charakterizovanou zvýšením frakce buněk pozitivních na annexin V, aktivací kaspáz, štěpením PARP a fragmentací DNA [115, 126, 155]. Buněčná smrt za účasti kaspáz indukovaná seleničitanem byla rovněž zaznamenána v případě buněk mesotheliomu [133], zatímco buňky malobuněčného karcinomu plic linie U-1285 [124] a buňky linie Hep2 [112] reagovaly na seleničitan sodný apoptózou doprovázenou fragmentací DNA, případně pozitivitou na annexin V, avšak na kaspázách nezávislou. V případě linií HCT 116 a HCT 116-p53KO jsme zaznamenali aktivaci kaspáz v průběhu 24 h inkubace se seleničitanem sodným v koncentraci 10 μ M. Použitý fluorescenční inhibitor kaspáz (FLICA) nerozlišuje mezi kaspázami 3 a 7 a detekuje tedy souhrnně aktivitu obou těchto efektorových kaspáz. Z výsledků vyplývá, že v buňkách linie HCT 116 došlo k aktivaci kaspáz 3 a 7 časněji a ve významně větším rozsahu než v buňkách linie HCT 116-p53KO. Také morfologické změny v buňkách obou linií zaznamenané časosběrnou mikroskopií svědčily o přítomnosti apoptózy s typickým zakulacováním buněk, ztrátou adherence k podkladu a tvorbou „blebs“.

Indukce oxidativního stresu seleničitanem byla pozorována v různých typech buněčných modelů a je považována za hlavní příčinu antiproliferativního působení seleničitanu [126, 133, 155]. U linie kolorektálního karcinomu SW 480 byla apoptóza indukovaná seleničitanem spojena s produkcí ROS a vzestupem koncentrace Ca^{2+} iontů [136]. Také v případě ovlivnění kolorektální linie HT29 seleničitanem jsme popsali apoptózu zprostředkovanou ROS [156]. Proto jsme se rozhodli ověřit, zda ROS hrají roli i v reakci buněk linie HCT 116 na ovlivnění seleničitanem sodným v koncentraci 10 μ M. Kombinované barvení buněk HCT 116 vitálními sondami MitoTracker® Green a MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator prokázalo produkci superoxidu v mitochondriích po ovlivnění v průběhu 24 h a to již od samého počátku tohoto intervalu. Dále jsme v průběhu 48 h pomocí přístroje xCELLigence monitorovali

proliferaci buněk HCT 116 ovlivněných seleničitanem sodným v kombinaci s BSO a MnTMPyP. BSO (L-buthionine-sulfoximine) blokuje γ -glutamylcystein syntetázu, klíčový enzym v syntéze glutathionu, a výrazně snižuje schopnost buněk vyrovnat se s oxidativním stresem [157]. Naopak MnTMPyP (Mn(III)tetrakis(1-Methyl-4-pyridyl)porphyrin pentachloride) je mimetikem superoxid dismutázy a působí tedy jako antioxidant [158]. BSO v kombinaci se seleničitanem sodným výrazně snižoval hodnoty buněčného indexu ve srovnání s působením samotného seleničitanu sodného, zatímco v přítomnosti MnTMPyP se antiproliferativní účinek seleničitanu sodného neprojevil. Protože MnTMPyP eliminuje hlavně superoxidové radikály, svědčí získané výsledky o tom, že buněčná smrt u buněk HCT 116 po ovlivnění seleničitanem je zprostředkována superoxidem.

Určité úskalí metody měření impedance systémem xCELLigence spočívá ve skutečnosti, že menší množství široce rozprostřených buněk je vyhodnoceno stejnou hodnotou buněčného indexu jako větší množství buněk méně rozprostřených, zato však intenzivněji proliferujících. Z prezentovaných proliferačních křivek je zřejmé, že v případě toxických účinků seleničitanu sodného samotného nebo v kombinaci s BSO dochází nejprve k přechodnému zvýšení buněčného indexu nad hodnoty kontrolních neovlivněných buněk, což nekoreluje s výsledky časosběrné mikroskopie a dalších metod použitých v této studii a je patrně důsledkem rozprostření buněk zablokovaných v S/G2 fázích buněčného cyklu. Proto na základě našich zkušeností doporučujeme kombinovat měření impedance s časosběrnou mikroskopií nebo jinou metodou pro ověření morfologie a skutečného počtu sledovaných buněk.

Oxidativní stres vyvolaný seleničitanem sodným může vést až k poškození DNA [159]. U buněk linií NIH 3T3 a HL-60 způsoboval seleničitan sodný poškození DNA a zvyšoval expresi ATM/ATR kináz, koncentrace 100 -500 μ M použité v této studii však výrazně převyšovaly běžně užívané experimentální dávky [160]. V našem případě u buněk HCT 116 již koncentrace 10 μ M indukovala zvýšení exprese fosforylované ATM kinázy a fosforylovaného histonu H2A.X, což svědčí o poškození DNA a citlivosti buněk HCT 116 k oxidativnímu stresu způsobenému seleničitanem.

Z našich výsledků vyplývá, že seleničitan sodný stimuluje v buňkách linií HCT 116 a HCT 116-p53KO produkci superoxidu, způsobuje oxidativní stres, inhibuje proliferaci zástavou buněčného cyklu v S/G2 fázích a indukuje buněčnou smrt za účasti kaspáz.

Tato zjištění jsou v souladu s údaji publikovanými kolektivem čínských autorů současně s naší prací, které popisují redox-dependentní aktivaci proteinu Bax, aktivaci kinázy JNK-1 a indukci apoptózy seleničitanem sodným u buněčných linií kolorektálního karcinomu SW 480, HCT 116 a HT29 [161, 162].

Naše výsledky dále ukázaly, že buňky linie HCT 116-p53KO jsou méně citlivé k působení seleničitanu sodného než původní linie divokého typu a že tedy přítomnost funkčního proteinu p53 může hrát roli v reakci buněk na ovlivnění seleničitanem sodným. V buněčném modelu promyelocytické leukémie linie NB4 bylo zjištěno, že seleničitan sodný indukuje translokaci p53 do mitochondrií a aktivuje mitochondriální cestu apoptózy [154]. Dále bylo prokázáno, že buňky lidského karcinomu prostaty linie LNCaP obsahující funkční protein p53 jsou citlivější k působení seleničitanu sodného než buňky linií p53-null PC3 a DU 145 a že aktivace p53 je nutná pro dlouhodobé udržení zvýšené produkce superoxidu v mitochondriích. U buněk karcinomu prostaty postrádajících funkční protein p53 tato zpětná vazba mezi p53 a mitochondriemi neexistuje a seleničitan zde indukuje buněčnou smrt v menším rozsahu a na kaspázách nezávislou [163, 164]. V našem buněčném modelu jsme však po ovlivnění seleničitanem sodným detekovali aktivované kaspázy 3 a 7 i v případě linie HCT 116-p53KO. Seleničitan sodný v koncentraci 10 μ M zvýšil expresi proteinu p53 v buňkách HCT 116, použití inhibitoru p53 pifithrinu- α však nemělo žádný vliv na snížení buněčné proliferace ani na aktivaci kaspáz. Buňky linií HCT 116 jsou tedy zřejmě schopné reagovat na seleničitan sodný aktivací kaspáz bez ohledu na p53 status, tato reakce je však u buněk divokého typu rychlejší a výraznější. Vzhledem k výše zmíněné nově odhalené roli proteinu Bax v apoptóze indukované seleničitanem u buněk HCT 116 [162] je možné se domnívat, že redoxní aktivace Bax se uplatňuje i v případě buněk HCT 116-p53KO a je příčinou aktivace apoptotické odpovědi těchto buněk i v nepřítomnosti funkčního p53. Touto hypotézou se chceme zabývat v naší další práci. Na druhou stranu výzkum v buněčném modelu mesotheliomu odhalil, že pifithrin- α sice nezabránil apoptóze indukované seleničitanem u ovlivněných buněk, snižoval však významně základní hladinu apoptózy u selenem neovlivněných kontrol. Autoři předpokládají, že p53 je přímo inaktivován seleničitanem a diskutují možné mechanismy této inaktivace včetně vytěsnění atomu zinku v p53 seleničitanem nebo redoxní inaktivace jeho cysteinových zbytků [133].

Významným buněčným mechanismem, který by mohl hrát roli v odpovědi buněk na seleničitan sodný, je také autofagie. Je známo, že regulace apoptózy a autofagie je vzájemně provázaná a že tyto dva mechanismy mohou v některých případech operovat společně v procesu vedoucím k buněčné smrti, v jiných naopak působí proti sobě [165]. Informace o roli autofagie v buněčné smrti indukované sloučeninami selenu jsou zatím skrovné. V buňkách gliomu indukoval seleničitan sodný v koncentraci 7 μ M autofagickou buněčnou smrt charakterizovanou zkracováním, zakulacováním a bobtnáním mitochondrií, snížením hladin mitochondriálních proteinů a pohlcováním mitochondrií autofagickými vakuolami. Zároveň nebyly pozorovány žádné známky apoptózy, reakce TUNEL byla negativní a proces buněčné smrti nebyl ovlivněn inhibitory kaspáz [166]. V buňkách promyelocytické leukémie seleničitan sodný naopak inhiboval autofagii zřejmě prostřednictvím PI3K/Akt dráhy a indukoval apoptózu, navíc inhibice autofagie specifickými inhibitory dále zvýšila rozsah apoptotické smrti indukované seleničitanem [167]. V naší práci jsme jako první detekovali markery autofagie u buněk kolorektálního karcinomu po ovlivnění seleničitanem sodným. Buňky linie HCT 116 v přítomnosti 10 μ M seleničitanu sodného vytvářely četné cytoplazmatické vakuoly viditelné ve fázově kontrastním mikroskopu. Jejich jednoznačná identifikace a analýza jejich obsahu v současné době probíhá, nicméně fluorescenční mikroskopie dále potvrdila pozitivitu těchto vakuol na barvení monodansylcadaverinem. Zároveň došlo ke zvýšení hladin modifikovaného proteinu LC3B, jenž je markerem časných autofagosomů a ke zvýšení exprese lysosomálního proteinu LAMP-1. Zdá se tedy, že apoptotická smrt indukovaná seleničitanem sodným je u buněk HCT 116 doprovázena autofagií. Protože bylo prokázáno, že p53 status buněk ovlivňuje rozsah autofagie a že buňky HCT 116-p53KO mají zvýšené základní hladiny autofagických markerů [168], není vyloučeno, že rozdíly v citlivosti buněk HCT 116 a HCT 116-p53KO mohou být částečně ovlivněny také interakcí mezi apoptotickými a autofagickými programy v těchto buňkách. Pokud by seleničitan skutečně zasahoval do mechanismů autofagie, znamenalo by to rozšíření jeho buněčných cílů o další oblast, z hlediska terapie nádorů potenciálně významnou.

7. ZÁVĚRY

1. Seleničitan sodný inhiboval proliferaci a indukoval buněčnou smrt buněk HCT 116 a HCT 116-p53KO v závislosti na koncentraci a době působení. Toxicita seleničitanu sodného se projevovala od koncentrace 2,5 μM , výrazný toxický účinek byl spojen s koncentrací 10 μM .
2. Seleničitan sodný v koncentračním rozmezí 2,5 μM - 10 μM měnil distribuci fází buněčného cyklu a expresi proteinů spojených s buněčným cyklem. Získané výsledky svědčí o zástavě buněčného cyklu v S/G2-M fázích.
3. Seleničitan sodný v koncentraci 10 μM indukoval u buněk linie HCT 116 produkci superoxidu v mitochondriích, poškození DNA, expresi proteinu p53 a buněčnou smrt za účasti kaspáz. Buněčná smrt způsobená seleničitanem je u těchto buněk doprovázena autofagií.
4. Buňky linie HCT 116-p53KO jsou v rámci sledovaného koncentračního rozmezí a časového intervalu méně citlivé k působení seleničitanu sodného než buňky linie HCT 116. Buňky linie HCT 116-p53KO jsou schopné odpovědět na působení seleničitanu sodného aktivací kaspáz, ne však v takové intenzitě jako buňky divokého typu. Použití pifithrinu- α neovlivnilo reakci buněk HCT 116 na toxické působení seleničitanu sodného. Získané výsledky svědčí o tom, že přítomnost funkčního proteinu p53 ovlivňuje reakci buněk HCT 116 na toxické působení seleničitanu sodného, zároveň se však v tomto modelu uplatňují i mechanismy na p53 nezávislé.

8. SEZNAM LITERATURY

1. Sharma, S.V., Haber, D.A., and Settleman, J. (2010). Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 10, 241-253.
2. Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*.
3. Dušek, L., Abrahámová, J., Mužík, J., Májek, O., Pavlík, T., Koptíková, J., Vyzula, R., and Fínek, J. (2009). Populační odhady počtu nemocných s kolorektálním karcinomem - jeden z nástrojů včasné diagnostiky časných stadií a rekurence onemocnění. *Farmakoterapie* 5, 11-20.
4. Büchler, T. (2009). Strategie a cíle léčby nemocných s kolorektálním karcinomem. *Kolorektální karcinom*, 31-37.
5. Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., and Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 525-532.
6. Gregorieff, A., and Clevers, H. (2005). Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 19, 877-890.
7. Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 11-22.
8. Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Velculescu, V.E. (2002). Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418, 934.
9. Pritchard, C.C., and Grady, W.M. (2010). Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*.
10. Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S.M., Riggins, G.J., et al. (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304, 554.
11. Grady, W.M., Rajput, A., Myeroff, L., Liu, D.F., Kwon, K., Willis, J., and Markowitz, S. (1998). Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res* 58, 3101-3104.
12. Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.
13. Green, D.R., and Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* 458, 1127-1130.
14. Olovnikov, I.A., Kravchenko, J.E., and Chumakov, P.M. (2009). Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor: regulation of energy metabolism and antioxidant defense. *Semin Cancer Biol* 19, 32-41.
15. Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
16. Li, F.P., and Fraumeni, J.F., Jr. (1969). Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 71, 747-752.
17. Soussi, T., Kato, S., Levy, P.P., and Ishioka, C. (2005). Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations. *Hum Mutat* 25, 6-17.

18. Wiman, K.G. (2006). Strategies for therapeutic targeting of the p53 pathway in cancer. *Cell Death Differ* 13, 921-926.
19. Leslie, A., Carey, F.A., Pratt, N.R., and Steele, R.J. (2002). The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg* 89, 845-860.
20. Russo, A., Bazan, V., Iacopetta, B., Kerr, D., Soussi, T., and Gebbia, N. (2005). The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 23, 7518-7528.
21. Iacopetta, B., Russo, A., Bazan, V., Dardanoni, G., Gebbia, N., Soussi, T., Kerr, D., Elsaleh, H., Soong, R., Kandioler, D., et al. (2006). Functional categories of TP53 mutation in colorectal cancer: results of an International Collaborative Study. *Ann Oncol* 17, 842-847.
22. Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., and Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 489-499.
23. Grady, W.M. (2004). Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23, 11-27.
24. Smith, G., Carey, F.A., Beattie, J., Wilkie, M.J., Lightfoot, T.J., Coxhead, J., Garner, R.C., Steele, R.J., and Wolf, C.R. (2002). Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9433-9438.
25. Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170.
26. Lynch, H.T., Lynch, P.M., Lanspa, S.J., Snyder, C.L., Lynch, J.F., and Boland, C.R. (2009). Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet* 76, 1-18.
27. Danielsen, S.A., Lind, G.E., Bjornslett, M., Meling, G.I., Rognum, T.O., Heim, S., and Lothe, R.A. (2008). Novel mutations of the suppressor gene PTEN in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability- and TP53 mutation- status. *Hum Mutat* 29, E252-262.
28. Popat, S., Hubner, R., and Houlston, R.S. (2005). Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 23, 609-618.
29. Esteller, M., Fraga, M.F., Guo, M., Garcia-Foncillas, J., Hedenfalk, I., Godwin, A.K., Trojan, J., Vaurs-Barriere, C., Bignon, Y.J., Ramus, S., et al. (2001). DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 10, 3001-3007.
30. Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301, 89-92.
31. Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J.G., Baylin, S.B., and Issa, J.P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8681-8686.
32. Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., Campan, M., Young, J., Long, T.I., Faasse, M.A., Kang, G.H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., et al. (2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 38, 787-793.

33. Issa, J.P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 988-993.
34. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436-444.
35. Szlosarek, P., Charles, K.A., and Balkwill, F.R. (2006). Tumour necrosis factor- α as a tumour promoter. *Eur J Cancer* 42, 745-750.
36. Sinicrope, F.A., and Gill, S. (2004). Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23, 63-75.
37. Esquela-Kerscher, A., and Slack, F.J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 259-269.
38. Agostini, M., Pucciarelli, S., Calore, F., Bedin, C., Enzo, M., and Nitti, D. (2010). miRNAs in colon and rectal cancer: A consensus for their true clinical value. *Clin Chim Acta* 411, 1181-1186.
39. Urban, O. (2008). Diagnostika kolorektálního karcinomu. *Onkologie* 2(1), 9-11.
40. Butrum, R.R., Clifford, C.K., and Lanza, E. (1988). NCI dietary guidelines: rationale. *Am J Clin Nutr* 48, 888-895.
41. Pardi, D.S., Loftus, E.V., Jr., Kremers, W.K., Keach, J., and Lindor, K.D. (2003). Ursodeoxycholic acid as a chemopreventive agent in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 124, 889-893.
42. Ulrich, C.M., Bigler, J., and Potter, J.D. (2006). Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. *Nat Rev Cancer* 6, 130-140.
43. Arber, N., and Levin, B. (2008). Chemoprevention of colorectal neoplasia: the potential for personalized medicine. *Gastroenterology* 134, 1224-1237.
44. Schottenfeld, D., and Beebe-Dimmer, J. (2006). Alleviating the burden of cancer: a perspective on advances, challenges, and future directions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 2049-2055.
45. Rajamanickam, S., and Agarwal, R. (2008). Natural products and colon cancer: current status and future prospects. *Drug Dev Res* 69, 460-471.
46. Meeran, S.M., and Katiyar, S.K. (2008). Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. *Front Biosci* 13, 2191-2202.
47. Du, W., Li, W.Y., Lu, R., and Fang, J.Y. (2010). Folate and fiber in the prevention of colorectal cancer: between shadows and the light. *World J Gastroenterol* 16, 921-926.
48. Marshall, J.R. (2008). Prevention of colorectal cancer: diet, chemoprevention, and lifestyle. *Gastroenterol Clin North Am* 37, 73-82, vi.
49. Chapkin, R.S., McMurray, D.N., and Lupton, J.R. (2007). Colon cancer, fatty acids and anti-inflammatory compounds. *Curr Opin Gastroenterol* 23, 48-54.
50. Fotiadis, C.I., Stoidis, C.N., Spyropoulos, B.G., and Zografos, E.D. (2008). Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 14, 6453-6457.
51. Arner, E.S. (2010). Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Exp Cell Res*.
52. Combs, G.F., Jr. (2001). Selenium in global food systems. *Br J Nutr* 85, 517-547.
53. Schrauzer, G.N. (2001). Nutritional selenium supplements: product types, quality, and safety. *J Am Coll Nutr* 20, 1-4.

54. Brigelius-Flohe, R. (2008). Selenium compounds and selenoproteins in cancer. *Chem Biodivers* 5, 389-395.
55. Rayman, M.P. (2005). Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc* 64, 527-542.
56. Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2002). How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol* 22, 3565-3576.
57. Lu, J., and Holmgren, A. (2009). Selenoproteins. *J Biol Chem* 284, 723-727.
58. Papp, L.V., Lu, J., Holmgren, A., and Khanna, K.K. (2007). From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 9, 775-806.
59. Fairweather-Tait, S.J., Collings, R., and Hurst, R. (2010). Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am J Clin Nutr*.
60. Butler, J.A., Beilstein, M.A., and Whanger, P.D. (1989). Influence of dietary methionine on the metabolism of selenomethionine in rats. *J Nutr* 119, 1001-1009.
61. Navarro-Alarcon, M., and Cabrera-Vique, C. (2008). Selenium in food and the human body: a review. *Sci Total Environ* 400, 115-141.
62. Hamilton, S.J. (2004). Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Sci Total Environ* 326, 1-31.
63. (2000). Selenium. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. . I.o.M. Food and Nutrition Board, ed. (Washington, DC: National Academy Press), pp. 284-324.
64. Ashton, K., Hooper, L., Harvey, L.J., Hurst, R., Casgrain, A., and Fairweather-Tait, S.J. (2009). Methods of assessment of selenium status in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 89, 2025S-2039S.
65. (2002). Human Vitamin and Mineral Requirements. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation., F.a.A.O.W.H. Organization, ed. (Bangkok: FAO / WHO), pp. 105-122.
66. Goldhaber, S.B. (2003). Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 38, 232-242.
67. Yang, G., Yin, S., Zhou, R., Gu, L., Yan, B., Liu, Y., and Liu, Y. (1989). Studies of safe maximal daily dietary Se-intake in a seleniferous area in China. Part II: Relation between Se-intake and the manifestation of clinical signs and certain biochemical alterations in blood and urine. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 3, 123-130.
68. Hartikainen, H. (2005). Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *J Trace Elem Med Biol* 18, 309-318.
69. Vincent, J.L., and Forceville, X. (2008). Critically elucidating the role of selenium. *Curr Opin Anaesthesiol* 21, 148-154.
70. Pitney, C.L., Royal, M., and Klebert, M. (2009). Selenium supplementation in HIV-infected patients: is there any potential clinical benefit? *J Assoc Nurses AIDS Care* 20, 326-333.
71. Kohrle, J., and Gartner, R. (2009). Selenium and thyroid. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23, 815-827.
72. Shamberger, R.J., and Frost, D.V. (1969). Possible protective effect of selenium against human cancer. *Can Med Assoc J* 100, 682.

73. Schrauzer, G.N., White, D.A., and Schneider, C.J. (1977). Cancer mortality correlation studies--IV: associations with dietary intakes and blood levels of certain trace elements, notably Se-antagonists. *Bioinorg Chem* 7, 35-56.
74. Blot, W.J., Li, J.Y., Taylor, P.R., Guo, W., Dawsey, S., Wang, G.Q., Yang, C.S., Zheng, S.F., Gail, M., Li, G.Y., et al. (1993). Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J Natl Cancer Inst* 85, 1483-1492.
75. Li, J.Y., Taylor, P.R., Li, B., Dawsey, S., Wang, G.Q., Ershow, A.G., Guo, W., Liu, S.F., Yang, C.S., Shen, Q., et al. (1993). Nutrition intervention trials in Linxian, China: multiple vitamin/mineral supplementation, cancer incidence, and disease-specific mortality among adults with esophageal dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 85, 1492-1498.
76. Patterson, B.H., and Levander, O.A. (1997). Naturally occurring selenium compounds in cancer chemoprevention trials: a workshop summary. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6, 63-69.
77. Clark, L.C., Combs, G.F., Jr., Turnbull, B.W., Slate, E.H., Chalker, D.K., Chow, J., Davis, L.S., Glover, R.A., Graham, G.F., Gross, E.G., et al. (1996). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *Jama* 276, 1957-1963.
78. Duffield-Lillico, A.J., Reid, M.E., Turnbull, B.W., Combs, G.F., Jr., Slate, E.H., Fischbach, L.A., Marshall, J.R., and Clark, L.C. (2002). Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11, 630-639.
79. Thorpe, J.F., Jain, S., Marczylo, T.H., Gescher, A.J., Steward, W.P., and Mellon, J.K. (2007). A review of phase III clinical trials of prostate cancer chemoprevention. *Ann R Coll Surg Engl* 89, 207-211.
80. Trumbo, P.R. (2005). The level of evidence for permitting a qualified health claim: FDA's review of the evidence for selenium and cancer and vitamin E and heart disease. *J Nutr* 135, 354-356.
81. Klein, E.A., Thompson, I.M., Lippman, S.M., Goodman, P.J., Albanes, D., Taylor, P.R., and Coltman, C. (2003). SELECT: the selenium and vitamin E cancer prevention trial. *Urol Oncol* 21, 59-65.
82. Lippman, S.M., Klein, E.A., Goodman, P.J., Lucia, M.S., Thompson, I.M., Ford, L.G., Parnes, H.L., Minasian, L.M., Gaziano, J.M., Hartline, J.A., et al. (2009). Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Jama* 301, 39-51.
83. Clark, L.C., Hixson, L.J., Combs, G.F., Jr., Reid, M.E., Turnbull, B.W., and Sampliner, R.E. (1993). Plasma selenium concentration predicts the prevalence of colorectal adenomatous polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2, 41-46.
84. Russo, M.W., Murray, S.C., Wurzelmann, J.I., Woosley, J.T., and Sandler, R.S. (1997). Plasma selenium levels and the risk of colorectal adenomas. *Nutr Cancer* 28, 125-129.

85. Nelson, R.L., Davis, F.G., Sutter, E., Kikendall, J.W., Sobin, L.H., Milner, J.A., and Bowen, P.E. (1995). Serum selenium and colonic neoplastic risk. *Dis Colon Rectum* 38, 1306-1310.
86. Ghadirian, P., Maisonneuve, P., Perret, C., Kennedy, G., Boyle, P., Krewski, D., and Lacroix, A. (2000). A case-control study of toenail selenium and cancer of the breast, colon, and prostate. *Cancer Detect Prev* 24, 305-313.
87. Early, D.S., Hill, K., Burk, R., and Palmer, I. (2002). Selenoprotein levels in patients with colorectal adenomas and cancer. *Am J Gastroenterol* 97, 745-748.
88. Fernandez-Banares, F., Cabre, E., Esteve, M., Mingorance, M.D., Abad-Lacruz, A., Lachica, M., Gil, A., and Gassull, M.A. (2002). Serum selenium and risk of large size colorectal adenomas in a geographical area with a low selenium status. *Am J Gastroenterol* 97, 2103-2108.
89. Connelly-Frost, A., Poole, C., Satia, J.A., Kupper, L.L., Millikan, R.C., and Sandler, R.S. (2006). Selenium, Apoptosis, and Colorectal Adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15, 486-493.
90. Jacobs, E.T., Jiang, R., Alberts, D.S., Greenberg, E.R., Gunter, E.W., Karagas, M.R., Lanza, E., Ratnasinghe, L., Reid, M.E., Schatzkin, A., et al. (2004). Selenium and colorectal adenoma: results of a pooled analysis. *J Natl Cancer Inst* 96, 1669-1675.
91. Persson-Moschos, M.E., Stavenow, L., Akesson, B., and Lindgarde, F. (2000). Selenoprotein P in plasma in relation to cancer morbidity in middle-aged Swedish men. *Nutr Cancer* 36, 19-26.
92. Hu, Y., Benya, R.V., Carroll, R.E., and Diamond, A.M. (2005). Allelic loss of the gene for the GPX1 selenium-containing protein is a common event in cancer. *J Nutr* 135, 3021S-3024S.
93. Gladyshev, V.N., Factor, V.M., Housseau, F., and Hatfield, D.L. (1998). Contrasting patterns of regulation of the antioxidant selenoproteins, thioredoxin reductase, and glutathione peroxidase, in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 251, 488-493.
94. Zhuo, P., and Diamond, A.M. (2009). Molecular mechanisms by which selenoproteins affect cancer risk and progression. *Biochim Biophys Acta* 1790, 1546-1554.
95. Meplan, C., Hughes, D.J., Pardini, B., Naccarati, A., Soucek, P., Vodickova, L., Hlavata, I., Vrana, D., Vodicka, P., and Hesketh, J.E. (2010). Genetic variants in selenoprotein genes increase risk of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 31, 1074-1079.
96. Irons, R., Carlson, B.A., Hatfield, D.L., and Davis, C.D. (2006). Both selenoproteins and low molecular weight selenocompounds reduce colon cancer risk in mice with genetically impaired selenoprotein expression. *J Nutr* 136, 1311-1317.
97. Davis, C.D., Feng, Y., Hein, D.W., and Finley, J.W. (1999). The chemical form of selenium influences 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-DNA adduct formation in rat colon. *J Nutr* 129, 63-69.
98. El-Bayoumy, K., Das, A., Boyiri, T., Desai, D., Sinha, R., Pittman, B., and Amin, S. (2003). Comparative action of 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate and its metabolites against 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adduct formation

- in the rat and cell proliferation in rat mammary tumor cells. *Chem Biol Interact* 146, 179-190.
99. El-Bayoumy, K., and Sinha, R. (2005). Molecular chemoprevention by selenium: a genomic approach. *Mutat Res* 591, 224-236.
 100. Jackson, M.I., and Combs, G.F., Jr. (2008). Selenium and anticarcinogenesis: underlying mechanisms. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11, 718-726.
 101. Spallholz, J.E., Palace, V.P., and Reid, T.W. (2004). Methioninase and selenomethionine but not Se-methylselenocysteine generate methylselenol and superoxide in an in vitro chemiluminescent assay: implications for the nutritional carcinostatic activity of selenoamino acids. *Biochem Pharmacol* 67, 547-554.
 102. Gopalakrishna, R., Chen, Z.H., and Gundimeda, U. (1997). Selenocompounds induce a redox modulation of protein kinase C in the cell, compartmentally independent from cytosolic glutathione: its role in inhibition of tumor promotion. *Arch Biochem Biophys* 348, 37-48.
 103. Park, H.S., Park, E., Kim, M.S., Ahn, K., Kim, I.Y., and Choi, E.J. (2000). Selenite inhibits the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) through a thiol redox mechanism. *J Biol Chem* 275, 2527-2531.
 104. Park, H.S., Huh, S.H., Kim, Y., Shim, J., Lee, S.H., Park, I.S., Jung, Y.K., Kim, I.Y., and Choi, E.J. (2000). Selenite negatively regulates caspase-3 through a redox mechanism. *J Biol Chem* 275, 8487-8491.
 105. Kim, I.Y., and Stadtman, T.C. (1997). Inhibition of NF-kappaB DNA binding and nitric oxide induction in human T cells and lung adenocarcinoma cells by selenite treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12904-12907.
 106. Zeng, H. (2001). Arsenic suppresses necrosis induced by selenite in human leukemia HL-60 cells. *Biol Trace Elem Res* 83, 1-15.
 107. Lu, J., and Jiang, C. (2005). Selenium and cancer chemoprevention: hypotheses integrating the actions of selenoproteins and selenium metabolites in epithelial and non-epithelial target cells. *Antioxid Redox Signal* 7, 1715-1727.
 108. Sanmartin, C., Plano, D., and Palop, J.A. (2008). Selenium compounds and apoptotic modulation: a new perspective in cancer therapy. *Mini Rev Med Chem* 8, 1020-1031.
 109. Zeng, H., and Combs, G.F., Jr. (2008). Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J Nutr Biochem* 19, 1-7.
 110. Jiang, C., Wang, Z., Ganther, H., and Lu, J. (2002). Distinct effects of methylseleninic acid versus selenite on apoptosis, cell cycle, and protein kinase pathways in DU145 human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 1, 1059-1066.
 111. Kim, Y.S., Jhon, D.Y., and Lee, K.Y. (2004). Involvement of ROS and JNK1 in selenite-induced apoptosis in Chang liver cells. *Exp Mol Med* 36, 157-164.
 112. Rudolf, E., Rudolf, K., and Cervinka, M. (2008). Selenium activates p53 and p38 pathways and induces caspase-independent cell death in cervical cancer cells. *Cell Biol Toxicol* 24, 123-141.
 113. Tung, Y.T., Hsu, W.M., Wang, B.J., Wu, S.Y., Yen, C.T., Hu, M.K., and Liao, Y.F. (2008). Sodium selenite inhibits gamma-secretase activity through activation of ERK. *Neurosci Lett* 440, 38-43.

114. Hu, H., Jiang, C., Li, G., and Lu, J. (2005). PKB/AKT and ERK regulation of caspase-mediated apoptosis by methylseleninic acid in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 26, 1374-1381.
115. Jiang, C., Hu, H., Malewicz, B., Wang, Z., and Lu, J. (2004). Selenite-induced p53 Ser-15 phosphorylation and caspase-mediated apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther* 3, 877-884.
116. Wang, Z., Jiang, C., and Lu, J. (2002). Induction of caspase-mediated apoptosis and cell-cycle G1 arrest by selenium metabolite methylselenol. *Mol Carcinog* 34, 113-120.
117. Jiang, C., Wang, Z., Ganther, H., and Lu, J. (2001). Caspases as key executors of methyl selenium-induced apoptosis (anoikis) of DU-145 prostate cancer cells. *Cancer Res* 61, 3062-3070.
118. Shilo, S., and Tirosh, O. (2003). Selenite activates caspase-independent necrotic cell death in Jurkat T cells and J774.2 macrophages by affecting mitochondrial oxidant generation. *Antioxid Redox Signal* 5, 273-279.
119. Yan, L., Yee, J.A., Li, D., McGuire, M.H., and Graef, G.L. (1999). Dietary supplementation of selenomethionine reduces metastasis of melanoma cells in mice. *Anticancer Res* 19, 1337-1342.
120. Hurst, R., Elliott, R.M., Goldson, A.J., and Fairweather-Tait, S.J. (2008). S-methylselenocysteine alters collagen gene and protein expression in human prostate cells. *Cancer Lett* 269, 117-126.
121. Kim, Y., Lee, Y.S., Choe, J., Lee, H., Kim, Y.M., and Jeoung, D. (2008). CD44-epidermal growth factor receptor interaction mediates hyaluronic acid-promoted cell motility by activating protein kinase C signaling involving Akt, Rac1, Phox, reactive oxygen species, focal adhesion kinase, and MMP-2. *J Biol Chem* 283, 22513-22528.
122. Wang, Z., Hu, H., Li, G., Lee, H.J., Jiang, C., Kim, S.H., and Lu, J. (2008). Methylseleninic acid inhibits microvascular endothelial G1 cell cycle progression and decreases tumor microvessel density. *Int J Cancer* 122, 15-24.
123. Husbeck, B., Nonn, L., Peehl, D.M., and Knox, S.J. (2006). Tumor-selective killing by selenite in patient-matched pairs of normal and malignant prostate cells. *Prostate* 66, 218-225.
124. Jonsson-Videsater, K., Bjorkhem-Bergman, L., Hossain, A., Soderberg, A., Eriksson, L.C., Paul, C., Rosen, A., and Bjornstedt, M. (2004). Selenite-induced apoptosis in doxorubicin-resistant cells and effects on the thioredoxin system. *Biochem Pharmacol* 67, 513-522.
125. Olm, E., Fernandes, A.P., Hebert, C., Rundlof, A.K., Larsen, E.H., Danielsson, O., and Bjornstedt, M. (2009). Extracellular thiol-assisted selenium uptake dependent on the x(c)- cystine transporter explains the cancer-specific cytotoxicity of selenite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11400-11405.
126. Hu, H., Jiang, C., Schuster, T., Li, G.X., Daniel, P.T., and Lu, J. (2006). Inorganic selenium sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through superoxide/p53/Bax-mediated activation of mitochondrial pathway. *Mol Cancer Ther* 5, 1873-1882.
127. Schroeder, C.P., Goeldner, E.M., Schulze-Forster, K., Eickhoff, C.A., Holtermann, P., and Heidecke, H. (2004). Effect of selenite combined with chemotherapeutic

- agents on the proliferation of human carcinoma cell lines. *Biol Trace Elem Res* 99, 17-25.
128. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
 129. Vindelov, L.L. (1977). Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. *Virchows Arch B Cell Pathol* 24, 227-242.
 130. Whanger, P.D. (2002). Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *J Am Coll Nutr* 21, 223-232.
 131. Muecke, R., Schomburg, L., Buentzel, J., Kisters, K., and Micke, O. (2010). Selenium or no selenium--that is the question in tumor patients: a new controversy. *Integr Cancer Ther* 9, 136-141.
 132. Brozmanova, J., Manikova, D., Vlckova, V., and Chovanec, M. (2010). Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. *Arch Toxicol* 84, 919-938.
 133. Nilsonne, G., Olm, E., Szulkin, A., Mundt, F., Stein, A., Kocic, B., Rundlof, A.K., Fernandes, A.P., Bjornstedt, M., and Dobra, K. (2009). Phenotype-dependent apoptosis signalling in mesothelioma cells after selenite exposure. *J Exp Clin Cancer Res* 28, 92.
 134. Cao, T.M., Hua, F.Y., Xu, C.M., Han, B.S., Dong, H., Zuo, L., Wang, X., Yang, Y., Pan, H.Z., and Zhang, Z.N. (2006). Distinct effects of different concentrations of sodium selenite on apoptosis, cell cycle, and gene expression profile in acute promyelocytic leukemia-derived NB4 cells. *Ann Hematol* 85, 434-442.
 135. Stewart, M.S., Spallholz, J.E., Neldner, K.H., and Pence, B.C. (1999). Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. *Free Radic Biol Med* 26, 42-48.
 136. Wang, H. (2003). Both calcium and ROS as common signals mediate Na₂SeO₃-induced apoptosis in SW480 human colonic carcinoma cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* 97, 221-230.
 137. Brattain, M.G., Fine, W.D., Khaled, F.M., Thompson, J., and Brattain, D.E. (1981). Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res* 41, 1751-1756.
 138. Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497-1501.
 139. Waldman, T., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1995). p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 55, 5187-5190.
 140. Ferrandiz, N., Martin-Perez, J., Blanco, R., Donertas, D., Weber, A., Eilers, M., Dotto, P., Delgado, M.D., and Leon, J. (2009). HCT116 cells deficient in p21(Waf1) are hypersensitive to tyrosine kinase inhibitors and adriamycin through a mechanism unrelated to p21 and dependent on p53. *DNA Repair (Amst)* 8, 390-399.
 141. McDermott, U., Longley, D.B., Galligan, L., Allen, W., Wilson, T., and Johnston, P.G. (2005). Effect of p53 status and STAT1 on chemotherapy-induced, Fas-mediated apoptosis in colorectal cancer. *Cancer Res* 65, 8951-8960.

142. Magrini, R., Bhonde, M.R., Hanski, M.L., Notter, M., Scherubl, H., Boland, C.R., Zeitz, M., and Hanski, C. (2002). Cellular effects of CPT-11 on colon carcinoma cells: dependence on p53 and hMLH1 status. *Int J Cancer* 101, 23-31.
143. Mahyar-Roemer, M., and Roemer, K. (2001). p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. *Oncogene* 20, 3387-3398.
144. Bunz, F., Hwang, P.M., Torrance, C., Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Williams, J., Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1999). Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* 104, 263-269.
145. Schroterova, L., Kralova, V., Voracova, A., Haskova, P., Rudolf, E., and Cervinka, M. (2009). Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: comparison of different cytotoxicity assays. *Toxicol In Vitro* 23, 1406-1411.
146. Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134.
147. Sinha, R., Said, T.K., and Medina, D. (1996). Organic and inorganic selenium compounds inhibit mouse mammary cell growth in vitro by different cellular pathways. *Cancer Lett* 107, 277-284.
148. Zeng, H., Wu, M., and Botnen, J.H. (2009). Methylselenol, a selenium metabolite, induces cell cycle arrest in G1 phase and apoptosis via the extracellular-regulated kinase 1/2 pathway and other cancer signaling genes. *J Nutr* 139, 1613-1618.
149. Maga, G., and Hubscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 116, 3051-3060.
150. Innocente, S.A., and Lee, J.M. (2005). p53 is a NF-Y- and p21-independent, Sp1-dependent repressor of cyclin B1 transcription. *FEBS Lett* 579, 1001-1007.
151. Wang, Y., and Prives, C. (1995). Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature* 376, 88-91.
152. Watson, J.L., Hill, R., Yaffe, P.B., Greenshields, A., Walsh, M., Lee, P.W., Giacomantonio, C.A., and Hoskin, D.W. (2010). Curcumin causes superoxide anion production and p53-independent apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Lett* 297, 1-8.
153. Rooprai, H.K., Kyriazis, I., Nuttall, R.K., Edwards, D.R., Zicha, D., Aubyn, D., Davies, D., Gullan, R., and Pilkington, G.J. (2007). Inhibition of invasion and induction of apoptosis by selenium in human malignant brain tumour cells in vitro. *Int J Oncol* 30, 1263-1271.
154. Guan, L., Huang, F., Li, Z., Han, B., Jiang, Q., Ren, Y., Yang, Y., and Xu, C. (2008). P53 transcription-independent activity mediates selenite-induced acute promyelocytic leukemia NB4 cell apoptosis. *BMB Rep* 41, 745-750.
155. Xiang, N., Zhao, R., and Zhong, W. (2009). Sodium selenite induces apoptosis by generation of superoxide via the mitochondrial-dependent pathway in human prostate cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 63, 351-362.
156. Králová, V., Červinka, M., Rudolf, E. (2010). ROS mediate selenite-induced apoptosis in colon cancer cells. *Central European Journal of Biology* 5, 166-177.

157. Chen, X., Carystinos, G.D., and Batist, G. (1998). Potential for selective modulation of glutathione in cancer chemotherapy. *Chem Biol Interact* 111-112, 263-275.
158. Zhong, W., Yan, T., Webber, M.M., and Oberley, T.D. (2004). Alteration of cellular phenotype and responses to oxidative stress by manganese superoxide dismutase and a superoxide dismutase mimic in RWPE-2 human prostate adenocarcinoma cells. *Antioxid Redox Signal* 6, 513-522.
159. Lu, J., Kaeck, M., Jiang, C., Wilson, A.C., and Thompson, H.J. (1994). Selenite induction of DNA strand breaks and apoptosis in mouse leukemic L1210 cells. *Biochem Pharmacol* 47, 1531-1535.
160. Zhou, N., Xiao, H., Li, T.K., Nur, E.K.A., and Liu, L.F. (2003). DNA damage-mediated apoptosis induced by selenium compounds. *J Biol Chem* 278, 29532-29537.
161. Fang, W., Han, A., Bi, X., Xiong, B., and Yang, W. (2010). Tumor inhibition by sodium selenite is associated with activation of c-Jun NH2-terminal kinase 1 and suppression of beta-catenin signaling. *Int J Cancer* 127, 32-42.
162. Huang, F., Nie, C., Yang, Y., Yue, W., Ren, Y., Shang, Y., Wang, X., Jin, H., Xu, C., and Chen, Q. (2009). Selenite induces redox-dependent Bax activation and apoptosis in colorectal cancer cells. *Free Radic Biol Med* 46, 1186-1196.
163. Zhao, R., Xiang, N., Domann, F.E., and Zhong, W. (2006). Expression of p53 Enhances Selenite-Induced Superoxide Production and Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* 66, 2296-2304.
164. Li, G.X., Hu, H., Jiang, C., Schuster, T., and Lu, J. (2007). Differential involvement of reactive oxygen species in apoptosis induced by two classes of selenium compounds in human prostate cancer cells. *Int J Cancer* 120, 2034-2043.
165. Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.U., and Kimchi, A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* 16, 966-975.
166. Kim, E.H., Sohn, S., Kwon, H.J., Kim, S.U., Kim, M.J., Lee, S.J., and Choi, K.S. (2007). Sodium selenite induces superoxide-mediated mitochondrial damage and subsequent autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res* 67, 6314-6324.
167. Ren, Y., Huang, F., Liu, Y., Yang, Y., Jiang, Q., and Xu, C. (2009). Autophagy inhibition through PI3K/Akt increases apoptosis by sodium selenite in NB4 cells. *BMB Rep* 42, 599-604.
168. Morselli, E., Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Kepp, O., Criollo, A., Vicencio, J.M., Soussi, T., and Kroemer, G. (2008). Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy. *Cell Cycle* 7, 3056-3061.